

Der Einfluss des Blut-Hirn-Schranken ABC-Transporters ABCC1 auf die Pathogenese der Alzheimer Demenz

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Universität Rostock
Deutschland

Cathleen Lange

Geboren am 11. Juni 1983; in Rostock
Rostock, im Juni 2012

Verteidigung

16.11.2012; Hörsaal 201, Institut für Biowissenschaften

Gutachter

Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schröder; Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jens Pahnke; Universität Magdeburg, Institut für Neurologie

„...Dass ich erkenne, was die Welt im Innersten zusammenhält! ...“

(Johann-Wolfgang von Goethe; Faust I)

Für Emma

Inhalt

| | |
|--|----|
| Inhalt..... | 4 |
| 1. Zusammenfassung..... | 7 |
| 2. Einleitung..... | 9 |
| 2.1 Neurodegenerative Erkrankungen..... | 9 |
| 2.2 Demenzen | 10 |
| 2.3 Alzheimer Demenz Pathogenese | 12 |
| 2.4 Blut-Hirn-Schranke und Blut-Liquor-Schranke..... | 16 |
| 2.5 ABC-Transporter..... | 18 |
| 2.5.1 Der ABC-Transporter ABCB1..... | 19 |
| 2.5.2 Der ABC-Transporter ABCC1..... | 19 |
| 2.5.3 Der ABC-Transporter ABCG2 | 20 |
| 2.6 Alzheimer Demenz und ABC-Transporter | 21 |
| 2.7 Therapieoptionen | 22 |
| 2.7.1 Thiethylperazin..... | 23 |
| 2.8 Tiermodelle | 24 |
| 2.8.1 ABC-Transporter defiziente Mausmodelle | 24 |
| 2.8.2 Mausmodelle der Alzheimer Demenz..... | 25 |
| 3. Zielstellung | 27 |
| 4. Material und Methoden..... | 28 |
| 4.1 Tiermodelle | 28 |
| 4.2 Tierhaltung..... | 28 |
| 4.3 Behandlung der Versuchstiere mit Thiethylperazin | 28 |
| 4.4 Anzahlen der verwendeten Versuchstiere | 29 |
| 4.5 Gewebepräparation | 31 |
| 4.6 ELISA (Enzyme-linked immunosorbant Assay) | 31 |
| 4.7 Immunhistochemie..... | 32 |
| 4.7.1 A β und NeuN Färbungen | 32 |
| 4.7.2 Iba/A β Doppelfärbung | 33 |
| 4.8 ECTA (Endothelial Cell Transwell Assay)..... | 34 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.8.1 | <i>Gliazellpräparation</i> | 34 |
| 4.8.2 | <i>Präparation von Kapillarendothelien</i> | 35 |
| 4.8.3 | <i>ECTA Durchführung</i> | 37 |
| 4.9 | RNA Isolation | 38 |
| 4.10 | Microarray | 38 |
| 4.11 | Western Blot | 39 |
| 4.12 | ABCC1 Aktivitätsassay | 41 |
| 4.13 | Verhaltensanalysen | 42 |
| 4.13.1 | <i>Watermaze</i> | 42 |
| 4.13.2 | <i>Y-Maze</i> | 42 |
| 4.14 | Statistische Auswertungen | 43 |
| 5. | Ergebnisse | 45 |
| 5.1 | Expressionsanalyse und Lokalisation der ABC-Transporter | 45 |
| 5.2 | APP/PS1 ABC-Transporter defiziente Mausmodelle | 46 |
| 5.2.1 | <i>Immunhistochemische Untersuchungen APP/PS1 ABC-Transporter defizienter Mausmodelle</i> | 46 |
| 5.2.1 | <i>ELISA Messungen in APP/PS1 ABC-Transporter defizienten Mausmodellen</i> | 50 |
| 5.2.2 | <i>Einfluss APP-spaltender Enzyme und Aβ-Proteasen auf die Ablagerungsraten</i> | 54 |
| 5.2.3 | <i>Einfluss von Mikroglia auf die Ablagerungenraten</i> | 55 |
| 5.2.4 | <i>In vitro Analysen zur Transportkapazität des ABC-Transporters ABCC1</i> | 57 |
| 5.3 | APP/PS1 Mausmodelle mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten | 58 |
| 5.3.1 | <i>Immunhistochemische Untersuchungen von APP/PS1 Mausmodellen mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten</i> | 58 |
| 5.3.2 | <i>ELISA Messungen in APP/PS1 Mausmodellen mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten</i> | 60 |
| 5.3.1 | <i>In vitro Analysen zur Aβ42 Transportkapazität in Stämmen mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten</i> | 64 |
| 5.3.2 | <i>Microarray Analysen zur Identifizierung kompensatorischer Mechanismen</i> | 65 |
| 5.4 | Therapieansätze | 66 |
| 5.4.1 | <i>Der Einfluss des Thiethylperazins auf die Aktivität von ABCC1</i> | 66 |
| 5.4.2 | <i>Behandlung von APP/PS1-Tieren im genetischen FVB/N Hintergrund</i> | 67 |
| 5.4.3 | <i>Behandlung von APP/PS1 Tieren mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten</i> | 74 |
| 5.4.4 | <i>Behandlung von APP/PS1 Tieren im genetischen C57BL/6 Hintergrund</i> | 77 |

| | |
|--|-----|
| 6. Diskussion | 82 |
| 6.1 Die Alzheimer Demenz als multifaktorielle Erkrankung des zentralen Nervensystems | 82 |
| 6.2 Der Einfluss der ABC-Transporter auf die Pathogenese der Alzheimer Demenz... | 83 |
| 6.2.1 <i>Der Einfluss von ABCB1</i> | 84 |
| 6.2.2 <i>Der Einfluss von ABCC1 und des Plexus choroideus</i> | 85 |
| 6.2.3 <i>Der Einfluss von ABCG2</i> | 86 |
| 6.3 Einflüsse kombinierter ABC-Transporter Defizite auf die A β -Akkumulation und mögliche Regulationsmechanismen | 87 |
| 6.4 Beeinflussbarkeit von ABC-Transportern | 88 |
| 6.4.1 <i>Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin und die Wirksamkeit auf die Faktoren der Alzheimer Demenz Pathogenese</i> | 88 |
| 6.4.2 <i>Der Einfluss des inhibierenden Effektes des Thiethylperazins auf ABCB1</i> | 89 |
| 6.4.3 <i>Der Effekt des Thiethylperazins auf das Verhalten</i> | 89 |
| 6.4.4 <i>Der Effekt der Thiethylperazin Behandlung auf die Anzahl der Neuronen</i> | 90 |
| 6.4.5 <i>Thiethylperazin – als Therapieoption</i> | 91 |
| 7. Referenzen..... | 93 |
| 8. Abkürzungsverzeichnis..... | 103 |
| 9. Abbildungsverzeichnis | 107 |
| 10. Tabellenverzeichnis..... | 110 |
| 11. Erklärung..... | 111 |
| 12. Curriculum Vitae | 112 |
| 13. Danksagung | 114 |

1. Zusammenfassung

In Deutschland stellt die Alzheimer Demenz (AD), als häufigste Ursache für Demenzerkrankungen im höheren Lebensalter ein gravierendes individuelles, familiäres und gesellschaftliches Problem dar. Bereits heute sind mindestens 45% der über 80-jährigen Bevölkerung von einer Demenzerkrankung betroffen. Im Zuge der bevölkerungsstrukturellen Entwicklung Deutschlands in den nächsten 40 Jahren und der Tatsache, dass die durchschnittliche Lebenserwartung von heute 76-82 Jahre auf 88-90 Jahre bis Mitte des Jahrhunderts ansteigen wird, ist damit zu rechnen, dass sich die Zahl der weltweit Erkrankten von heute 12 Millionen bis 2050 mehr als verdreifachen wird ^(1, 2).

Eines der charakteristischen morphologischen Merkmale der AD ist die intrazerebrale Akkumulation des Peptids β -Amyloid ($A\beta$) im Gehirn in Form von Plaques und Gefäßamyloid. Die Mechanismen für die Entstehung dieser Ablagerungen sind bis heute noch nicht geklärt, es herrschen lediglich Hypothesen vor, welche die Überproduktion des Peptids oder Defizite in seiner Proteolyse in den Vordergrund rücken. Aspekte eines verminderten beziehungsweise gestörten Exports durch molekulare Transportmechanismen an der Blut-Hirn-Schranke sind bisher kaum untersucht. Durch die Generierung eines genetisch modifizierten Mausmodells zur Überproduktion des humanen APP/PS1 auf der einen Seite und dem Defizit für jeweils einen ABC-Transporter auf der anderen Seite, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass ABCB1 Einfluss auf die $A\beta$ -Ablagerungsraten im Gehirn nimmt. Dies wurde bereits in früheren *in vitro* Studien deutlich. Gleichzeitig konnte aber auch indiziert werden, dass der bis dato im Zusammenhang mit der $A\beta$ -Proteostase völlig unbekannte ABC-Transporter ABCC1, welcher hauptsächlich im Plexus choroideus (PC) exprimiert wird, einen erheblichen Einfluss auf die $A\beta$ -Akkumulation im Gehirn ausübt. Zusätzlich wurde deutlich gemacht, dass ein Defizit mehrerer ABC-Transporter nicht zu forcierten $A\beta$ -Akkumulationen führt, was kompensatorische Mechanismen, hervorgerufen durch weitere, weitgehend unbekannte Transportmoleküle, vermuten lässt und somit den Einfluss dieser auf die AD-Pathogenese unterstützt.

Gleichzeitig sollte eine gezielte Aktivierung von ABCC1 im APP/PS1-Mausmodell die Ablagerungsraten deutlich mindern. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien mittels Thiethylperazin, einem bekannten ABCC1-Aktivator, waren in der Lage, im Mausmodell signifikante Reduktionen in der $A\beta$ -Akkumulation zu erzielen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten erstmals, dass der ABC-Transporter ABCC1 einen großen Einfluss auf die $A\beta$ -Proteostase hat, dass der Amyloidefflux zu großen Teilen über den Plexus choroideus erfolgt und dass es durch gezieltes Einwirken auf ABC-Transporter

möglich ist, die Akkumulationsraten zu beeinflussen. Als Konsequenz hieraus könnten sich neue Therapieansätze für die Alzheimer Demenz ergeben.

2. Einleitung

2.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen repräsentieren eine große Gruppe neurologischer Erkrankungen mit einer Fülle klinischer und pathologischer Ausprägungen. Oftmals gehen sie einher mit Bewegungsstörungen, dem Verfall kognitiver Funktionen, Demenzen oder Atrophien betroffener Areale des peripheren und zentralen Nervensystems. Im Allgemeinen kann jedoch der kontinuierliche Verlust der Funktionsweise von Neuronen als Neurodegeneration bezeichnet werden ^(3, 4). Diverse akute und chronische Formen der Neurodegenerativen Erkrankungen sind bekannt. So beschreibt eine akute ND den rapiden, neuronalen Verlust in Folge von Schlaganfällen oder Traumata, wobei der Verlust innerhalb von Stunden oder Tagen, nach dem Initialereignis eintreten kann ⁽⁵⁾. Als chronische Formen der Neurodegeneration gelten Erkrankungen wie die Alzheimer Demenz (AD) oder die Demenz mit Lewy-Körperchen (DLK).

Die Gemeinsamkeit aller bekannten neurodegenerativen Erkrankungen ist der progressive Verlauf, welcher zu einer direkten Nekrose führt oder aber in einer verzögerten Apoptose von Neuronen mündet ⁽⁴⁾.

In den meisten Fällen sind die Ursachen der neurodegenerativen Erkrankungen und die molekularen Mechanismen, welche dahinter stehen, gänzlich unbekannt. Die Mehrheit der Erkrankungen ist multifaktoriell und wird durch diverse Faktoren, wie anormale Proteinaggregationen, oxidativen Stress, Traumata, Entzündungen, Schlaganfälle, Diabetes und Infektionen begünstigt. Aber auch hormonelle Ungleichgewichte, Entzündungen, Tumore, Bluthochdruck, Depressionen und Defizite in der Vitaminversorgung können Einfluss nehmen ⁽⁶⁾. Oftmals werden in diesem Zusammenhang auch Umweltwelteinflüsse wie Schwermetalle und Pestizide (z.B. Organophosphate), der Lebenswandel (Kaffeekonsum, Rauchen und Alkoholismus), das Geschlecht, der Bildungsstand, ethnische Zugehörigkeit und der sozioökonomische Status genannt ^(4, 7). Das größte Risiko, neben einer genetischen Vorbelastung wie bei Chorea Huntington, geht aber vom Alter aus. Und durch die stetig steigende Lebenserwartung ist innerhalb der nächsten Generationen mit einer andauernden Zunahme der Erkrankungen zu rechnen ^(3, 4, 8).

2.2 Demenzen

Bei der Demenz handelt es sich um ein Syndrom, als Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Erkrankung des Gehirns mit Störung vieler höherer, kortikaler Funktionen einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Lernfähigkeit, Sprechen und Sprache ⁽⁹⁾. Meist werden die Symptome einer Demenz begleitet durch Veränderungen der Persönlichkeit, dem Sozialverhalten und dem Rückgang der Motivation. Es kommt zu Beeinträchtigungen der Orientierungs- und Auffassungsgabe, sowie dem Urteilsvermögen ^(1, 10). Laut Definition erfolgt keine Veränderung des Bewusstseins („Bewusstseinsklarheit“), dies soll einen Verwirrheitszustand ausschließen, ist aber in fortgeschrittenen Stadien einer Demenz nicht mehr gegeben ⁽¹¹⁾.

Demenzen gelten als die psychischen Alterserkrankungen schlechthin. Während sie bei unter 65-Jährigen vergleichsweise selten auftreten, wird mit steigendem Alter eine exponentielle Zunahme verzeichnet. Derzeit wird von einer Prävalenz von unter 2% bei den 65-69-Jährigen ausgegangen. Dieser Wert verdoppelt sich alle 5 Jahre und liegt bei 80-84-Jährigen bereits bei 10-17% und bei den über 90-Jährigen leiden bereits über 30% an einer mittelschweren bis schweren Demenz. In Deutschland manifestiert sich die Demenz jährlich bei 300.000 Menschen (einschließlich sehr leichter Formen), wobei 60% der Neuerkrankten über 80 Jahre alt sind und 70% der Betroffenen Frauen ⁽¹¹⁾. Weltweit wird von einer Anzahl an Betroffenen von 24,3 Millionen ausgegangen mit 4,6 Millionen Neuerkrankungen jährlich und einer Prognose, dass sich die Zahl der Betroffenen alle 20 Jahre verdoppeln wird bis auf 81,1 Millionen im Jahr 2040 ⁽¹²⁾.

Unterteilungen der Demenzen in Kategorien sind vielfältig. Grundsätzlich können Demenzen jedoch in primäre und sekundäre Formen eingeteilt werden. Sekundäre Demenzen machen 10% der Fälle aus und sind auf andere Grunderkrankungen wie Stoffwechselerkrankungen oder Vergiftungserscheinungen in Folge von Medikamentenmissbrauch zurückzuführen. Die primären Formen der Demenzen sind irreversibel, betreffen 90% der Fälle und beschreiben Erkrankungen, deren Ursachen im Gehirn des Betroffenen selbst liegen. Die am häufigsten vorkommende Form der primären Demenzen ist die Alzheimer Demenz mit etwa 60% der Fälle. Diese Angaben schwanken je nach Literaturangabe, zwischen 40% und 80%, da oftmals keine reine Alzheimer Demenz, sondern Mischformen vorliegen. Diese Mischformen, in der Regel aus der AD und VD (Vaskuläre Demenz), liegen bei circa 15-20% der Erkrankten vor. Hierbei kommt zu Überlappungen der Symptome von AD und VD. Oftmals werden Mischformen erst post mortem diagnostiziert. Die zweithäufigste Ursache für das Auftreten einer Demenz ist die Vaskuläre Demenz (VD) mit rund 20% der Fälle, gefolgt von

selteneren Formen, wie Demenzen mit Lewy-Körperchen oder Frontotemporale Demenzen ^(1, 13-15).

Tabelle 1: Unterteilung und Charakteristik der am häufigsten vorkommenden Demenzerkrankungen. (Adaptiert aus ^(13, 16)).

| Art der Demenzerkrankung | Charakteristik der Erkrankungsformen | |
|----------------------------------|---|---|
| | Klinische Symptome | Pathologische Veränderungen |
| Alzheimer Demenz (AD) | <ul style="list-style-type: none"> - graduelles Entstehen - Vermindertes Gedächtnis - Apathie und Depressionen - Zunehmende Beeinträchtigung des Urteilsvermögens - Verwirrtheit, Desorientierung - Beeinträchtigung des Sprechvermögens und Gehens | <ul style="list-style-type: none"> - Amyloide Ablagerungen (Plaques) - Neurofibrilläre Bündel (Tangles) |
| Vaskuläre Demenzen (VD) | <ul style="list-style-type: none"> - Schrittweise Entstehung - Symptome ähnlich denen der Alzheimer Demenz - Gedächtnis minder schwer betroffen, - dafür ausgeprägte Stimmungsschwankungen | <ul style="list-style-type: none"> - Einzelne Infarkte in kritischen Regionen - oder diffuse Multi-Infarkte |
| Mischformen | <ul style="list-style-type: none"> - Hauptsächlich gekennzeichnet durch Symptome der AD und VD, es können aber auch andere Demenzformen beteiligt sein | <ul style="list-style-type: none"> - Vielfältig - keine einheitliche Pathologie |
| Demenz mit Lewy Körperchen (DLK) | <ul style="list-style-type: none"> - der degenerative Prozess ähnelt der AD - kognitive Fluktuationen - Halluzinationen - Muskelstarre und Tremor | <ul style="list-style-type: none"> - kortikale Lewy-Körperchen (α-Synuclein), welche sich innerhalb von Nervenzellen ausprägen |
| Frontotemporale Demenzen | <ul style="list-style-type: none"> - Persönlichkeitsveränderungen - Verhaltensänderungen - Enthemmung - Sprachschwierigkeiten | <ul style="list-style-type: none"> - Frontotemporale Schädigungen |

2.3 Alzheimer Demenz Pathogenese

Die Alzheimer Demenz als neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems tritt überwiegend bei Patienten über 65 Jahren auf und ist charakterisiert durch den stetig steigenden Neuronen Verlust und einer damit einhergehenden fortschreitenden Hirnatrophie, welche initial die Hippocampus-Formation und im weiteren Verlauf der Erkrankung weite Teile des zerebralen Kortex betrifft.

Mehr als 1,2 Millionen Deutsche sind von dieser am häufigsten auftretenden Demenzerkrankung betroffen, die bereits 1906 erstmals von Alois Alzheimer (s. Abb. 1A) beschrieben worden ist ⁽¹⁷⁾. Hierzu hatte er nach dem Tod von Auguste Deter, die zu Lebzeiten unter Gedächtnisstörungen, Halluzinationen, Apraxie und anderen Symptomen litt, das Gehirn der Patientin untersucht und typische Merkmale wie Atrophien, Proteinablagerungen im zerebralen Kortex und erstmals neurofibrilläre Bündel (Tangles) beschrieben ⁽¹⁸⁾. 1910 wurde die Erkrankung offiziell durch Emil Kraepelin nach ihrem Entdecker Alois Alzheimer benannt ⁽¹⁹⁾.

Zu den Risikofaktoren, welche die Entwicklung einer sporadischen Alzheimer Demenz erhöhen oder bedingen können, gehören neben kardiovaskulären Erkrankungen, Schädel-Hirn-Traumata, Bluthochdruck und Diabetes auch der Lebenswandel in Form von Alkoholmissbrauch und Bildungsstand. Aber auch das Geschlecht spielt eine Rolle, so sind mehr Frauen als Männer betroffen, was vermutlich auf die höhere Lebenserwartung der weiblichen Bevölkerung zurückzuführen ist. Als größter Risikofaktor gilt das Alter ^(16, 20). Während nur 2-3 Prozent bei den 70-75-jährigen betroffen sind, steigt die Häufigkeit der Erkrankungen mit zunehmendem Alter an. Bei den über 90-Jährigen sind mehr als ein Drittel erkrankt. Mit der stetig steigenden Lebenserwartung wird sich die Zahl der Betroffenen in den nächsten 40 Jahren noch drastischer erhöhen. Alleine vier Millionen Patienten werden dabei auf Deutschland entfallen ^(21, 22). Und weltweit wird die Alzheimer Demenz nach kardiovaskulären Erkrankungen zur zweithäufigsten Todesursache avancieren ⁽¹³⁾.

Der Verlauf der Erkrankung kann dabei grob in drei Stadien eingeteilt werden, wobei er individuell vom Erkrankungsalter, den Lebensumständen und dem allgemeinen Gesundheitszustand des Einzelnen abhängt. Während sich das erste Stadium hauptsächlich durch leichte Gedächtnisstörungen, Kraftlosigkeit und auch durch die Angst vor Neuem definiert, äußert sich das zweite Stadium bereits durch einen Kontrollverlust über die eigene Person, eine verlangsamte Sprache und Auffassungsgabe und durch den Verlust der Persönlichkeit. Als sekundär auftretende Erkrankungen zeigen sich bei vielen Betroffenen

vor allem Depressionen. Im Endstadium der Erkrankung können die Patienten nicht mehr kauen oder schlucken. Sie erkennen niemanden mehr und verlieren die Kontrolle über ihre Körperfunktionen. Es treten vermehrt Infektionen oder andere Begleiterkrankungen auf, im Besonderen, wenn die Erkrankten bettlägerig werden. Die Beeinträchtigungen der Lebensfunktionen führen schließlich zum Tod. Nach Diagnosestellung verbleibt Patienten meist eine durchschnittliche Lebenserwartung von sieben Jahren ⁽²³⁾.

Auch für Angehörige und das Gesundheitssystem stellt die AD eine extreme Belastung dar. So belaufen sich die jährlichen Kosten weltweit bereits jetzt auf rund 250 Milliarden Euro, wobei nur direkte Belastungen betrachtet wurden. Es ist anzunehmen, dass sich die indirekt anfallenden Kosten auf ein vielfaches belaufen werden ⁽¹³⁾. Die Belastungen übersteigen damit bei weitem die anderer, bisher häufiger auftretenden Erkrankungen wie Schlaganfälle, Krebs oder Herzerkrankungen ⁽²⁴⁾.

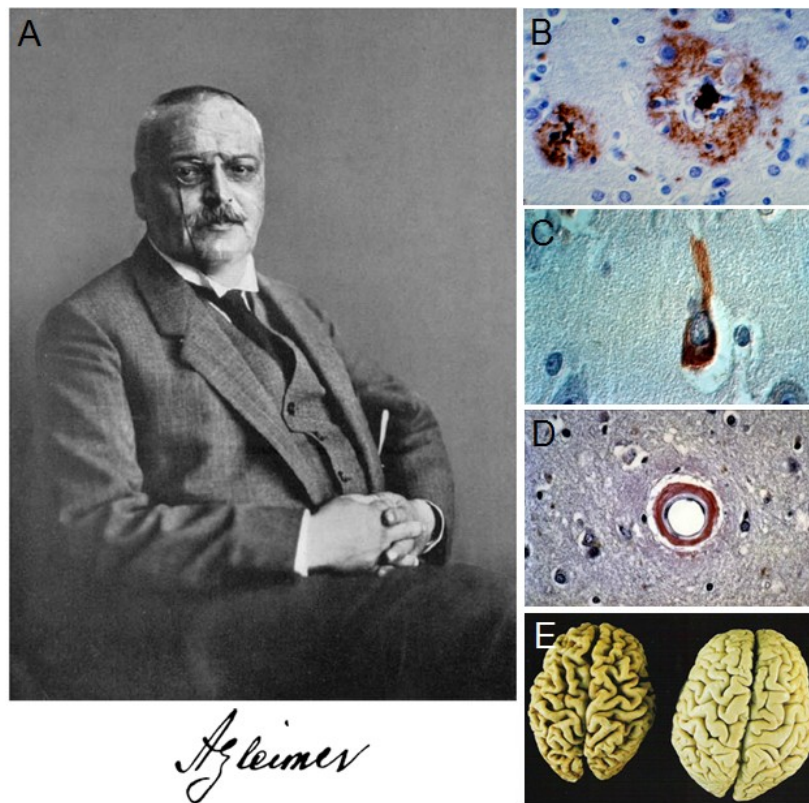


Abbildung 1: Beispiele für Veränderungen bei Patienten mit Alzheimer Demenz. (A) Alois Alzheimer (1864-1915), Entdecker der Alzheimer Demenz. (B) Extrazelluläre, amyloide Ablagerungen (Plaques). (C) Gefäßablagerungen von β -Amyloid. (D) Neurofibrilläre Tangles (Bündel) aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein. (E) Hirnathrophie mit Zunahme der Größe der Sulci und Abnahme der Breite der Gyri im Vergleich zu einem Hirn, welches nicht von einer AD betroffen ist. Färbungen: (B und C) Anti-A β (6F3D) und (D) Anti-tau (Phospho- τ). (Abbildungen adaptiert aus ^(19, 25).)

Die AD ist histomorphologisch gekennzeichnet durch neurofibrilläre Tangles (NFTs), Hirano-Körperchen, die granovaskuläre Neuronendegradation und vor allem durch intrazerebrale Ablagerungen von β -Amyloid ($A\beta$). Hierbei handelt es sich um ein Degradationsprodukt des Amyloid-Precursor-Proteins (APP), welches zwischen dem 16^{ten} und 17^{ten} Exon des *App* Gens zu finden ist, zwischen 38-43 Aminosäurereste lang ist und sich von der Ekto- bis zur Transmembrandomäne erstreckt ⁽²⁶⁾. $A\beta$ lagert sich extrazellulär als Gefäßamyloid und in kongophilen Plaques ab. Die 1992 begründete Amyloid-Hypothese ^(27, 28) besagt, dass diese Ablagerungen konsekutiv verschiedene Signalwege in den Neuronen aktivieren mit der Folge der Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, einem Bestandteil des Zytoskeletts, und nachfolgendem Zelluntergang. Dies führt zu makroskopisch sichtbaren Atrophien verschiedener Hirnareale, insbesondere des Hippocampus und der frontalen Hirnrinde ^(29, 30). Die Akkumulation des β -Amyloids in den Gefäßwänden der kortikalen Arterien und Kapillaren wird als kongophile oder zerebrale Amyloidangiopathie (CAA) bezeichnet ⁽³¹⁾ und tritt bei 90% bis 96% der AD Patienten auf ⁽³²⁾. Als ursächlich hierfür gilt eine gestörte perivaskuläre, lymphatische Drainage von $A\beta$ aus dem Gehirn.

Generiert wird $A\beta$ über die Spaltung des Membranprotein APP, dessen eigentliche Funktion weitestgehend unbekannt ist. Verschiedene Forschergruppen vermuten jedoch autokrine und parakrine Funktionen in der Wachstumsregulation und unterstützende Funktionen bei der Synapsenbildung ^(33, 34). Insgesamt umfasst das *App*-Gen 18 Exone auf Chromosom 21q21.3. Erstmals identifiziert wurde es 1987, als Teil einer kleinen Genfamilie, welche in Menschen nur drei Gene umfasst (*App*, *Aplp1* und *Aplp2*) ⁽³³⁾. Die Spaltung von APP erfolgt durch die Proteasen α -, β -, und γ -Sekretase. Dabei spaltet die α -Sekretase APP innerhalb der $A\beta$ -Domäne (Aminosäure 16) und verhindert somit eine Bildung desselben. Gebildet wird ein lösliches sAPP α Fragment. Die Prozessierung über die β - und γ -Sekretase setzt jedoch $A\beta$ frei. Durch den Schnitt der β -Sekretase wird ein lösliches sAPP β und ein Membran gebundenes Aminosäurefragment (C99), welches $A\beta$ beinhaltet, generiert. Eine anschließende Proteolyse durch die γ -Sekretase resultiert in der Bildung des 4kDa großen $A\beta$ -Peptids. Die γ -Sekretase kann an verschiedenen Angriffspunkten innerhalb des Proteins schneiden und damit $A\beta$ in der Länge von 38-43 Aminosäureresten freisetzen ⁽²⁶⁾ (s. Abb. 2). Bei der Spaltung besteht eine erhöhte Affinität zur Bildung von $A\beta$ 40, die größere Toxizität geht jedoch von $A\beta$ 42 aus, denn dieses längere, hydrophobere Fragment kann zu Oligomeren, Fibrillen und schlussendlich auch zu Plaques aggregieren ⁽³⁵⁾ und stellt den Hauptanteil zerebraler Plaques ⁽²⁶⁾. Die Ursachen für die pathologische Akkumulation, insbesondere in den älteren Teilen der Bevölkerung, liegen bisher im Unklaren.

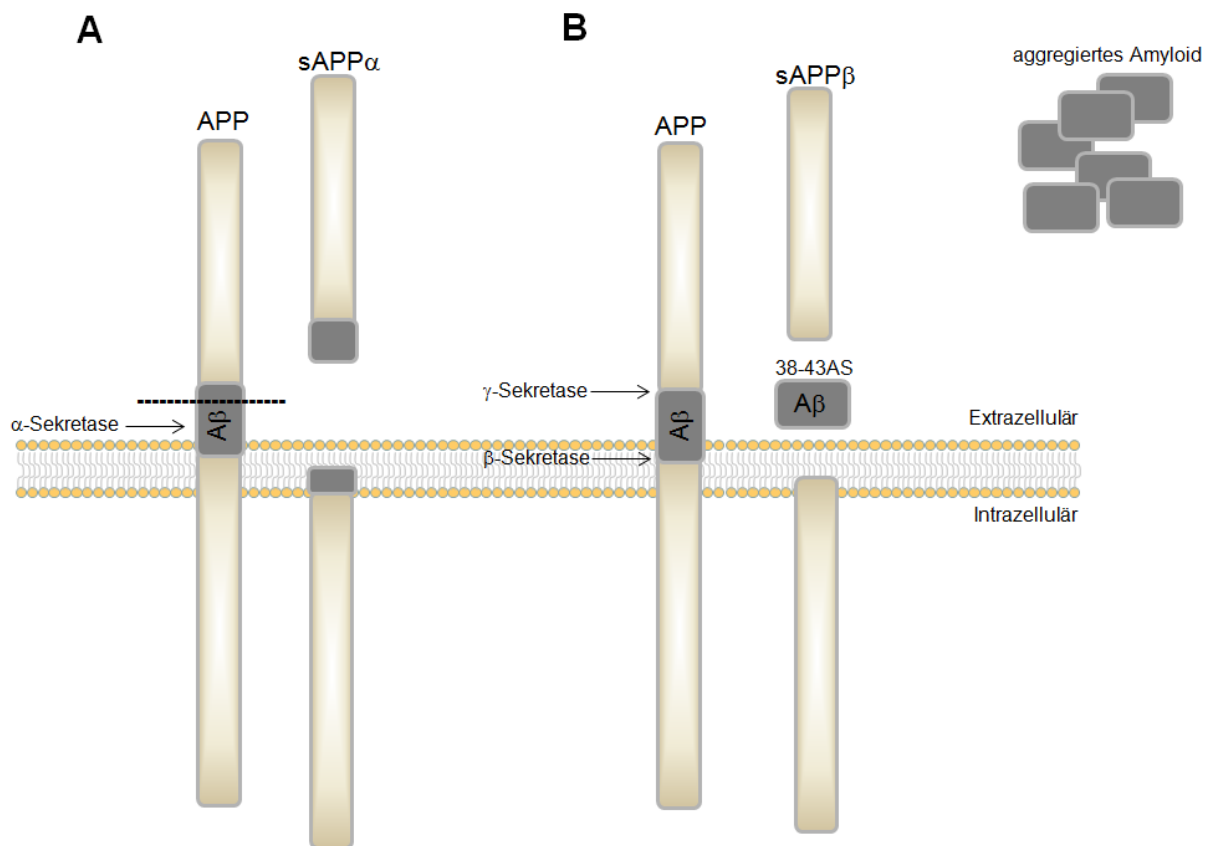


Abbildung 2: Prozessierung des APP durch α-, β- und γ-Sekretase. Proteolytische Enzyme schneiden das APP (Amyloid Precursor Protein) an verschiedenen Stellen, wodurch eine Vielzahl von Proteinen und Proteinfragmenten entsteht. **(A)** Durch die Spaltung der α-Sekretase entstehen zwei Fragmente. Aβ wird nicht gebildet. **(B)** Auf Grund der Spaltung durch die β- und die γ-Sekretase entstehen Aβ-Spezies zwischen 38-43 AS Länge.

In über 99% der Fälle liegt eine sporadische Form der AD vor, nur in weniger als 1% der Fälle, bisher circa 500 bekannte Familien, tritt die familiäre, also die vererbte Form der Alzheimer Demenz (FAD) auf. Die FAD zeichnet sich durch autosomal, zumeist dominante Mutationen aus, welche zu einer frühen, hereditären Erkrankungsform führen, die bereits ab einem Alter von 30 Jahren auftreten kann. Mutationen im Amyloid Precursor Protein (APP) auf Chromosom 21, Presenilin 1 (PS1) und im Presenilin 2 (PS2), welche in verschiedenen Familien gefunden wurden, gelten als ursächlich⁽³⁵⁾. Die Preseniline sind Proteine, welche in der intrazellulären Membran beheimatet sind⁽³⁶⁾. Sowohl das 46kDa große PS1, als auch das 55kDa PS2 sind in 12 Exonen, auf Chromosom 14 bzw. 1, organisiert⁽³⁷⁾. Als Mitglieder des γ-Sekretase Komplexes führen Mutationen in diesen Genen, genau wie im APP zu dramatischen Erhöhungen der Aβ-Gehalte^(38, 39).

Bei der sporadischen Form der AD finden sich keine Mutationen in den bekannten Alzheimer Genen, es gibt jedoch genetische Risikofaktoren, welche die Entwicklung der Erkrankung begünstigen können.

Ursächlich für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko kann die Ausbildung einer Trisomie 21 sein. Ein hoher Prozentsatz an Patienten mit Down Syndrom, welche ein zusätzliches Chromosom 21 tragen, auf dem auch das *App* Gen lokalisiert ist, bildet eine frühe Form der Alzheimer Demenz aus. Ausgelöst wird dies durch eine vermehrte Bildung von A β -Spezies, bereits in jungen Jahren, wobei deutlich mehr A β 42 nachgewiesen werden konnte ^(40, 41).

Auch andere Gene werden mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für die Entwicklung einer sporadischen Form der AD in Verbindung gebracht, z.B. das Apolipoprotein (ApoE). Lokalisiert ist es auf Chromosom 19 und kann in drei Isoformen vorliegen, die sich nur in den Aminosäurenresten 112 und 158 unterscheiden. ApoE2 kommt zu 5%-10% innerhalb der Bevölkerung vor und hat an beiden Stellen ein Cystein. ApoE3 kommt in der Bevölkerung am häufigsten vor (60%-70%), mit einem Cystein (112) und einem Arginin (158). ApoE4 (15%-20%) besitzt einen Arginin Rest an Position 112, was die Stabilität des Proteins reduziert ^(42, 43). Personen, welche zwei ApoE4 Allele besitzen, haben ein erhöhtes Risiko an der Alzheimer Demenz zu erkranken. Dies bedeutet jedoch nicht, dass Träger des Allels die Krankheit ausbilden ⁽¹⁶⁾.

2.4 Blut-Hirn-Schranke und Blut-Liquor-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine physikalische und metabolische Barriere zwischen dem Gehirn und dem Blutkreislauf, welche dafür sorgt, die Homöostase im Hirn aufrechtzuerhalten. Formiert wird die Blut-Hirn-Schranke aus drei zellulären Komponenten. Zum einen aus einer einzelnen Schicht zerebraler Kapillaren, deren Lumen durch Endothelzellen gebildet werden, welche zum anderen von Perizyten und astrozytären Fortsätzen flankiert werden. Sie bedecken die endotheliale Oberfläche um bis zu 90% und unterstützen die Funktionsweise der BHS. Die eigentliche Diffusionsbarriere bilden sogenannte Tight junctions (Zonulae occludens) zwischen den Endothelien. Ein Stoffaustausch, insbesondere von Nährstoffen und Metaboliten kann nur über freie Diffusion, parazelluläre Diffusion oder über einen aktiven Transport über die Endothelien mit Hilfe von Membrantransportern erfolgen. In der Regel erfolgt dies unter ATP-Hydrolyse entgegen eines Konzentrationsgradienten ^(44, 45). Die Endothelien der Blut-Hirn-Schranke beherbergen eine Vielzahl von Membrantransportern, welche in den Influx und Efflux einer Reihe

essentieller Substrate, wie Elektrolyte, Nucleoside, Aminosäuren und Glukose, involviert sind.

Historisch betrachtet, galt die BHS früher als reine Diffusionsbarriere, die den Import der meisten Substanzen aus dem Blut in das Gehirn blockierte und nur eine begrenzte Anzahl an Membran-Carrier'n enthielt ⁽⁴⁵⁾. Heute weiß man, dass die Blut-Hirn-Schranke eine komplexe, dynamische Struktur mit einer Reihe selektiv, aktiver Komponenten ist, wobei eine Vielzahl von ihnen Efflux Transporter sind, die unter ATP-Hydrolyse arbeiten ⁽⁴⁶⁾.

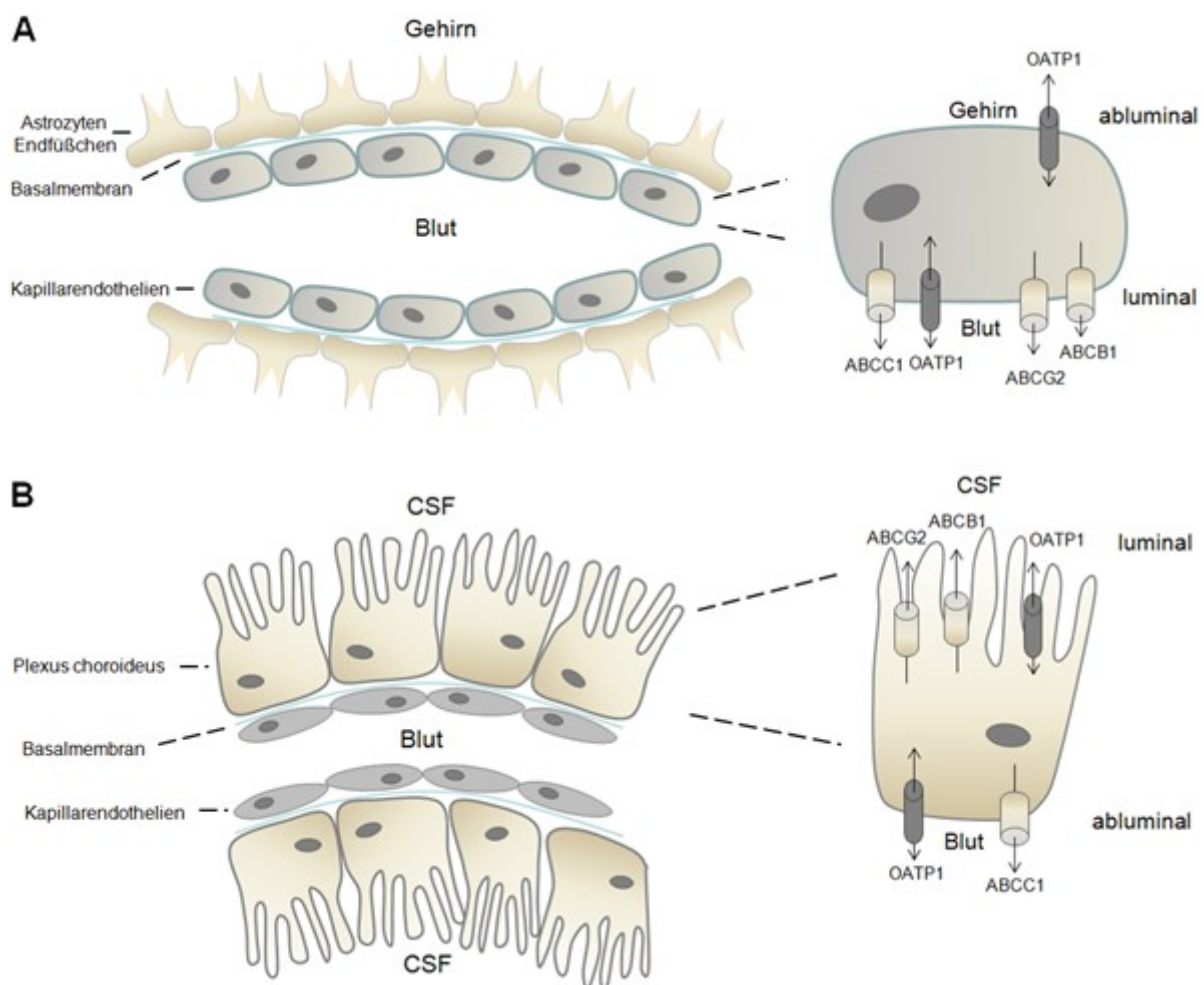


Abbildung 3: Aufbau der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke und die Verteilung der ABC-Transporter innerhalb der Barrieren. (A) Innerhalb der Blut-Hirn-Schranke sind die Transporter ABCB1, ABCG2 und ABCC1 apikal/luminal lokalisiert. OATP1 wird innerhalb der Blut-Hirn-Schranke sowohl luminal, als auch abluminal exprimiert ⁽⁴⁷⁾. (B) Im Plexus choroideus der Blut-Liquor-Schranke sind ABCB1 und ABCG2 apikal/luminal lokalisiert, während ABCC1 basolateral/abluminal exprimiert wird. OATP1 wird wiederum sowohl luminal, als auch abluminal exprimiert ⁽⁴⁸⁾. (Adaptiert von Sun *et al.* und Choudhuri *et al.* ^(49, 50)).

Die Blut-Liquor-Schranke, auch Blut-CSF-Barriere (BCSFB) genannt, bildet im Gehirn eine zweite Barriere aus. Sie wird aus einer einzelnen Schicht von Endothelien und Tight junctions des Plexus choroideus gebildet. Der Plexus choroideus, ein arteriovenöses Gefäßkonvolut der Ventrikel, produziert in seiner Hauptfunktion bis zu 500 Milliliter Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) täglich ⁽⁵¹⁾. Er dient als spezialisierte Vesikel-Struktur zur Aufrechterhaltung der Homöostase des zentralen Nervensystems, indem er den chemischen Austausch zwischen CSF und Hirngewebe kontrolliert. Klinische Studien haben neben der klassischen Funktion des Plexus choroideus auch Hinweise darauf gefunden, dass Endothelien des PC eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Cytokinen synthetisieren. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der Plexus choroideus im Alter und bei Neurodegeneration anatomischen Veränderungen unterliegt ⁽⁵²⁾. Es ist bewiesen worden, dass in AD Patienten die Dichte der Endothelzellen um 22% im Vergleich zu Kontrollen reduziert war ⁽⁵³⁾. Zudem konnte gezeigt werden, dass Amyloid über einen bisher unbekannten Mechanismus in die Cerebrospinalflüssigkeit transportiert wird ^(54, 55).

2.5 ABC-Transporter

Der Name ABC-Transporter wurde im Jahr 1992 durch Cris Higgins eingeführt ⁽⁵⁶⁾, auf Grund der charakteristisch, hoch konservierten ATP-bindenden Kasette (ATP-binding cassette – ABC) der Familie ⁽⁵⁷⁾. Laut Definition sind ABC-Transporter integrale Membranproteine, welche die Energie der ATP-Hydrolyse nutzen, um Stoffe über zelluläre Membranen zu transportieren. Gefunden wurden sie in sämtlichen Säugetier Spezies ⁽⁴⁴⁾. Bis heute konnten 49 Mitglieder der ABC-Familie in Menschen identifiziert und in sieben Subfamilien, von ABCA bis ABCG, unterteilt werden ^(57, 58), damit bilden sie eine der größten Proteinfamilien. Zu finden sind sie in Organen mit sekretorischen oder Barriere Funktionen einschließlich dem Darm, der Leber, der Lunge, den Nieren, sowie an der Blut-Hirn-Schranke und dem Plexus choroideus. Sie sind in der Lage eine Vielzahl von Stoffen, Medikamenten, Konjugaten, Metaboliten und hydrophoben Substanzen zu transportieren. Und mit ihrer asymmetrischen Anordnung an der apikalen bzw. basolateralen Plasmamembran von Epithelzellen dienen sie als effektive Barriere für toxische Moleküle, da sich der Hauptbesatz an ABC-Transportern an der apikalen Seite befindet ⁽⁵⁹⁾. Damit spielen sie für den Schutz von Geweben vor toxischen Stoffen und zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase eine entscheidende Rolle ^(57, 60).

Neben ihrer regulatorischen Funktion als Komponenten der Blut-Hirn-Schranke und Blut-Liquor-Schranke erfolgt die Expression der ABC-Transporter auch in Stammzellen einer Reihe von Geweben ⁽⁶¹⁾. Diverse *in vitro* Studien postulieren eine funktionelle Rolle von ABC-

Transportern in der Differenzierung und Erhaltung von Stammzellen ⁽⁶²⁻⁶⁴⁾. Im Zuge dessen konnte in diesen Studien nachgewiesen werden, dass Transporter-Defizite zu Beeinträchtigungen der Neurogenese und zu Neuro-funktionellen Veränderungen *in vivo* führen ⁽⁶⁵⁾.

2.5.1 Der ABC-Transporter ABCB1

ABCB1 oder auch P-glycoprotein (P-gp) genannt, ist ein 170kDa großes integrales Membranprotein. Welches, typischerweise für Transporter der ABCB-Familie, aus zwei Hauptdomänen aufgebaut ist, die eine stark konservierte Sequenzübereinstimmung teilen. Jede Hauptdomäne besteht aus einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer hydrophilen Nucleotid-bindenden Domäne, welche auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert ist. Je eine Nucleotid-bindende Domäne ist dabei mit einer Transmembrandomäne assoziiert. Und jede Transmembrandomäne ist ihrerseits aus sechs transmembranen Segmenten zusammengesetzt. Das gesamte Protein setzt sich aus 12 transmembranen Segmenten (α -Helices) zusammen, welche auf der apikalen/luminalen Seite der Plasmamembran zu finden sind.

Die humane ABCB Subfamilie beinhaltet 11 Mitglieder, sowie ein zusätzliches Pseudogen (ABCB10P), dass in der Literatur beschrieben worden ist ⁽⁵⁰⁾. Mit 1280 Aminosäuren, welche das Protein bilden, gehört ABCB1 zu den größten Vertretern seiner Familie. Lokalisiert ist ABCB1 nicht nur in der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke, sondern auch in anderen Geweben, wie der Leber, der Lunge, den Nieren oder der Plazenta ⁽⁶⁶⁾. Erstmals beschrieben worden ist ABCB1 im Zusammenhang mit multiplen Resistenzen gegen eine Vielzahl von Chemotherapeutika, daher abgeleitet auch seine ursprüngliche Namensgebung MDR1 (für Multidrug Resistance 1) ⁽⁴⁹⁾. ABCB1 ist in der Lage eine Vielzahl von Substanzen mit einer breiten strukturellen Diversitätsrate zu transportieren ⁽⁶⁷⁾. Dazu gehören nicht nur metabolische Produkte und Lipide, sondern ebenso eine Vielzahl von Medikamenten. Dies beinhaltet neben Chemotherapeutika, auch diverse Antibiotika, Antihyperthensiva, Antidepressiva, Antimykotika, Immunsuppressiva, Antiarrythmetika, Opiate u.a. ⁽⁶⁶⁾. Ebenso konnte gezeigt werden, dass A β ein Substrat für ABCB1 ist ⁽⁶⁸⁾.

2.5.2 Der ABC-Transporter ABCC1

Bisher sind 12 Mitglieder der Subfamilie ABCC bekannt. Aufgebaut sind ABCC1-ABCC3, sowie ABCC6 insgesamt aus 17 Transmembransegmenten, welche in drei Hauptdomänen,

mit jeweils sechs bzw. fünf Segmenten eingeteilt sind ⁽⁶⁷⁾. Zudem besitzt das Protein zwei Nucleotid-bindende Domänen, welche auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert sind. Im Gegensatz zu ABCB1 ist der N-Terminus extrazellulär angeordnet. Sie bestehen aus circa 1500 Aminosäuren. Der größte Vertreter ist ABCC2 mit 1548 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 190kDa. Die anderen Mitglieder der Familie sind von kleinerer Größe und ähneln in ihrem Aufbau mehr ABCB1. Sie bilden lediglich 12 transmembrane Segmente aus, welche in zwei Hauptdomänen organisiert sind und ihr N-Terminus ist wie bei ABCB1 intrazellulär angesiedelt ⁽⁶⁶⁾.

1992 wurde ABCC1, ein 190kDa großes Protein, in humanen Lungenkarzinom Zellenlinien entdeckt ⁽⁶⁹⁾ und erhielt zunächst die Nomenklatur MRP1 für Multidrug resistance-associated protein 1 ⁽⁷⁰⁾. Das *Abcc1*-Gen umfasst 31 Exone. ABCC1, wird in fast allen Organen wie der Leber, der Lunge, den Nieren, aber auch der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke exprimiert, in denen es in der Regel protektive Aufgaben übernimmt, durch seine abluminale Lokalisation. Ähnlich wie ABCB1 hat ABCC1 eine hohe Affinität zu amphipatischen Verbindungen ⁽⁷¹⁾, aber auch zu Sulfat- und Glutathionkonjugaten, welche keine Substrate von ABCB1 darstellen ⁽⁷²⁾.

2.5.3 Der ABC-Transporter ABCG2

Das *Abcg2*-Gen besteht aus 16 Exonen und umfasst mehr als 66kb ⁽⁵⁰⁾. ABCG2 ist ein klassischer Halbtransporter, aus 655 Aminosäuren ⁽⁷³⁾, der sechs transmembrane Segmente innerhalb einer Hauptdomäne enthält. Zudem besitzt er eine Nucleotid-bindende Domäne am N-Terminus der cytoplasmatischen Seite. Auf Grund seines Aufbaus ist davon auszugehen, dass ABCG2 bestrebt ist, Homodimere innerhalb der Zellmembran auszubilden, um als vollwertiger Transporter zu funktionieren ^(67, 74, 75).

Erstmals charakterisiert wurde ABCG2 1998 in einer humanen Brustkrebs Zelllinie (MCF-7), welche Chemoresistenzen ausbildete ⁽⁷⁶⁾ und so im Anschluss als BCRP1 (für breast cancer resistance protein 1) deklariert worden ist ⁽⁶⁶⁾.

Wie ABCB1 und ABCC1 ist auch ABCG2 im Menschen in einer ganzen Reihe von Organen zu finden, mit den höchsten Expressionsraten in der Plazenta ^(73, 76). Da er ebenfalls in der luminalen Membran humaner Kapillarendothelien lokalisiert ist, wird postuliert, dass er eine aktive Efflux Funktion in der Blut-Hirn-Schranke übernimmt. So sind eine Vielzahl von Chemotherapeutika Substrate für ABCG2. Wie ABCB1 auch, benötigt ABCG2 kein Glutathion (GSH) für den Transport neutraler, amphipatischer Substanzen. Seine Transportpräferenzen liegen zudem bei natürlichen Stoffen wie Flavonoiden und Porphyrinen ⁽⁷⁷⁾.

2.6 Alzheimer Demenz und ABC-Transporter

Die Entwicklung der extrazellulären, amyloiden Plaques ist eines der Hauptcharakteristika in der Alzheimer Demenz Pathogenese. Lange galten sie als ursächlich für das Neuronensterben und den zunehmenden geistigen Verfall. Auch biochemische und genetische Analysen unterstrichen die Bedeutung der A β Peptide in der AD ⁽⁷⁸⁾. Die amyloiden Ablagerungen bestehen aus A β , hauptsächlich den A β 40- und A β 42-Spezies, welche kontinuierlich in Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) durch die Spaltung von APP gebildet werden. Über die Zeit und mit zunehmendem Alter akkumulieren die löslichen A β -Spezies extrazellulär zu Multimeren, Oligomeren, Protofibrillen, Fibrillen und schlussendliche zu diffusen und ‚densed-cored‘ Plaques ^(35, 79, 80). Verschiedene Studien an AD-Patienten und AD-Mausmodellen unterstrichen diese Vermutungen, durch Messungen erhöhter A β -Gehalte ⁽⁸¹⁻⁸³⁾.

In den letzten Jahren kristallisierte sich jedoch heraus, dass die Anzahl der Plaques oft nicht mit dem Schweregrad der Demenz korreliert. Im Zuge dessen rücken vor allem lösliche Formen von A β in den Vordergrund und wurden als besonders neurotoxisch identifiziert ⁽⁵⁹⁾. Lesné *et al.* publizierten bereits im Jahr 2006 am AD-Mausmodell durchgeführte Studien, welche dokumentierten, dass Mäuse bereits starke Defizite in ihrer kognitiven Leistungsfähigkeit zeigten, unabhängig von einer signifikanten Plaquebildung, Neuronenverlusten oder einer sichtbaren Hirnathrophie. Gleichzeitig konnte ein 56kDa großes, lösliches A β -Dodecamer (A β *56) in den Tieren nachgewiesen werden, welches für die signifikant verminderte Gedächtnisleistung verantwortlich gemacht wurde ^(80, 84).

Überdies konnte gezeigt werden, dass gerade mangelnder Export und nicht etwa die Bildung toxischen β -Amyloids für die AD-Pathogenese von besonderer Bedeutung zu sein scheint, gestützt durch eine 2010 publizierte Studie ^(85, 86) an Demenzpatienten und den dazu gehörenden Kontrollpersonen. Es wurde nachgewiesen, dass beide Gruppen keine signifikanten Divergenzen in der A β -Produktion erkennen ließen, aber dass in Patienten mit AD der Export toxischen β -Amyloids um bis zu 30% reduziert war.

Unter dem Aspekt des Exports toxischer A β -Aggregate gewinnen Membrantransporter der Blut-Hirn-Schranke und auch der Blut-CSF-Barriere in der AD-Pathogenese zunehmend an Bedeutung.

Studien aus dem Jahr 2009 analysierten die Einflussnahme von ABCG2 auf die AD-Pathogenese. So konnten, sowohl in AD-Patienten, als auch in AD-Mausmodellen erhöhte Expressionsraten von ABCG2 in zerebralen Kapillarendothelien nachgewiesen werden. Dies bestätigte sich ebenfalls mittels *in vitro* Analysen unter A β -Zugabe. Bildgebende

Untersuchungsmethoden verifizierten signifikant erhöhte A β 40-Akkumulationsraten im Gehirn von ABCG2^{-/-}-Tieren gegenüber Wildtyp-Kontrollen. Hieraus ergab sich die Hypothese, dass eine erhöhte Expression von ABCG2 als Biomarker der AD-Pathogenese dienen könnte⁽⁸⁷⁾.

Bereits im Jahr 2001 publizierte die Arbeitsgruppe von Lam *et al.*⁽⁶⁸⁾ erstmals *in vitro* Studien, welche belegten, dass der ABC-Transporter ABCB1 ein Amyloid-Efflux Transporter ist. Es konnte gezeigt werden, dass ABCB1-defiziente Mausmodelle eine verminderte A β -Eliminierung aufwiesen. Gestützt wurden die Daten durch *in vitro* Versuche an ABCB1 transfizierten Nieren-Epithelzellen (LLC-PK1)⁽⁸⁸⁾.

Diverse andere Studien an ABC-Transportern, im besonderen ABCB1, konnten eine Beteiligung in der intrazerebralen/intrazellulären Verteilung von A β zeigen, da sie in verschiedenen intrazerebralen (Neuronen, Astrozyten und Mikroglia) und intrazellulären Kompartimenten detektiert werden konnten⁽⁸⁹⁻⁹⁵⁾.

2.7 Therapieoptionen

Bis heute sind keine wirksamen Medikamente bekannt, die das Fortschreiten der Alzheimer Demenz stark verlangsamen oder sie heilen und damit die stetig steigenden Patientenzahlen verringern könnten. Bisher beschränken sich Behandlungsmöglichkeiten auf die Therapie von Begleiterkrankungen und -symptomen und die Verhaltensstabilisierung, auf hirnleistungsfördernde Maßnahmen und prophylaktische, sowie neuroprotektive Maßnahmen. Derzeit sind nur fünf Stoffe durch die Behörden für die Therapie zugelassen – vier Acetylcholinesteraseinhibitoren und ein NMDA-Rezeptor-Antagonist. Leider wirken diese Medikamente nur symptomatisch. So arbeiten Acetylcholinesterase-Hemmer lediglich den funktionellen Konsequenzen, welche durch den Verlust cholinergischer Neurone entstehen, entgegen. Keines der Medikamente bedingt eine Reduktion der Amyloidablagerungen oder der Tau-Hyperphosphorylierung, wodurch die Erkrankung in 100% der Fälle tödlich verläuft⁽⁵⁹⁾.

Deshalb wird verstärkt nach neuen Ansätzen in der Behandlung gesucht. So sollen die Aktivierung A β -abbauender Enzyme (Neprilysin (NEP) und Insulin-degrading enzyme (IDE)) auf der einen Seite und die Inhibition der β - und γ -Sekretase auf der anderen Seite, die A β -Mengen reduzieren^(96, 97). Ein weiterer innovativer Ansatz ist eine A β -Immunisierung. Hierbei wird versucht, die Anzahl von A β -Plaques zu reduzieren⁽⁹⁸⁾. Erste post-mortem Untersuchungsergebnisse von Patienten aus dieser Studie⁽⁹⁹⁾ zeigten an den acht analysierten Gehirnen, dass die Plaqueanzahl um 30% gegenüber einer Kontrollgruppe

reduziert werden konnte, gleichzeitig erwies aber eine Untersuchung der Gefäße auf kongophile Amyloidangiopathie (CAA) und Mikroläsionen eine signifikante Erhöhung dieser ⁽¹⁰⁰⁾. Es schien, dass die Immunisierung zu einer Auflösung der Plaques und nachfolgend zu einer Akkumulation dieser jetzt löslichen Amyloidfragmente in den Gefäßwänden führte. Als Hauptproblem erwies sich jedoch, dass alle Patienten zum Todeszeitpunkt das histologische Endstadium der AD (laut der Braak'schen Skala ⁽¹⁰¹⁾) aufwiesen und dass keine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten oder eine Verlangsamung des Demenzfortschritts in klinischen Untersuchungen nachweisbar war. Dies stützt Hypothesen, dass lösliche A β -Spezies die eigentlich toxischen Formen darstellen und dass innovative Therapiemethoden gefunden werden müssen, welche an diesem Punkt ansetzen.

In der Literatur sind bereits einige Stoffe bekannt, die sich aktivierend auf bestimmte ABC-Transporter auswirken. In der Regel sind diese Funde reine Zufälle in dem Bestreben Inhibitoren für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika zu finden, da viele ABC-Transporter multiple Resistenzen gegenüber einer Reihe von Medikamenten ausbilden ⁽¹⁰²⁾. Oder aber es handelt sich um Toxine, welche für eine Behandlung nicht in Frage kommen ⁽¹⁰³⁾.

Aber auch Phytopharmaka geraten zusehends in den Fokus der Forschung. So konnte gezeigt werden, dass Hopfen Extrakte (*Humulus lupulus*) in der Lage sind die ABCB1 Expression zu erhöhen ⁽¹⁰⁴⁾. Auch das Johanniskraut (*Hypericum perforatum*), welches bereits heute zur Behandlung einer Reihe von Krankheiten eingesetzt wird, wie z.B. bei Depressionen ^(105, 106), soll sich positiv auf die Expression von ABCB1 auswirken ⁽¹⁰⁷⁾.

Auch Stoffe wie Curcumin aus der Gelbwurz (*Curcuma longa*) oder Flavonoide aus dem zweigriffeligen Weißdorn (*Crataegus oxyacantha*) erhöhen die Expressionsrate von ABCB1 ^(108, 109).

2.7.1 Thiethylperazin

Im Jahr 2009 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Wesolowska *et al.* ⁽¹¹⁰⁾ *in vitro* Studien zur Aktivierung von ABCC1 mittels Phenothiazinen. Phenothiazine gehören zur Stoffklasse der Neuroleptika und werden hauptsächlich zur Behandlung psychischer Erkrankungen, Übelkeit, Brechreiz und der Reisekrankheit eingesetzt. Sie sind in der Lage die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Zellmembranen zu modulieren. Des Weiteren ist ihre Fähigkeit zur Beeinflussung der Aktivität von ABCB1 bekannt. Viele bekannte Derivate gelten als Inhibitoren ⁽¹¹¹⁾. Unter Zuhilfenahme des Derivats Thiethylperazin konnte die Aktivität des ABC-Transporters ABCC1 in humaner Erythrozyten Kultur um 89% gesteigert

werden. Thiethylperazin ist als Arzneimittel seit den frühen 60-iger Jahren in Form von Torecan® (Novartis) bekannt, als Antiemetikum mit zentralen Angriffspunkten, sowohl in der Medulla oblongata, als auch im Brechzentrum selbst. Es wird noch heute in vielen Ländern wie der Schweiz oder den USA für die Behandlung von Übelkeit und Erbrechen und auch Schwindel verschiedenen Ursprungs mildernd oder verhindernd eingesetzt. Daraus ergeben sich Anwendungsmöglichkeiten bei Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts, bei Vergiftungen, nach Bestrahlungen oder Operationen oder bei Erkrankungen, die mit einer Schädigung des Gleichgewichtsorgans einhergehen. Ein direkter Zusammenhang zwischen Torecan® und der Alzheimer Demenz wurde bis dato noch nicht publiziert.

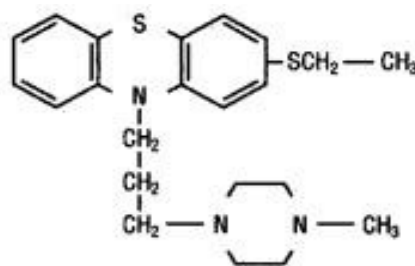


Abbildung 4: Chemische Zusammensetzung und Aufbau des Thiethylperazins. (Adaptiert aus ⁽¹¹²⁾).

2.8 Tiermodelle

2.8.1 ABC-Transporter defiziente Mausmodelle

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl neuer Mausmodelle mit ABC-Transporter Defiziten in der Blut-Hirn-Schranke etabliert. Primär wurden diese Modelle zur Untersuchung der Substratspezifität der Transporter und der Wirkungsweise pharmazeutischer Erzeugnisse genutzt ^(44, 49, 113-116).

Nagetiere wie Mäuse sind für diese Art von Modellen prädestiniert, da für die meisten humanen ABC-Transporter homologe Gene in Nagetieren existieren. So wird ABCB1 in Mäusen von zwei Genen kodiert. *Abcb1a* und *Abcb1b* mit einer übereinstimmenden Gewebe Lokalisation, einschließlich der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke ^(114, 117).

Zusätzlich liefern diese Modelle Aussagen zu kompensatorischen Regulationsmechanismen. So zeigen ABCB1a, ABCB1b und ABCC1 dreifach Transporter-defiziente Tiere Induktionen in der ABCG2 Expression während einer Behandlung mit Mitoxantron, Topotecan oder Doxorubicin ⁽¹¹⁸⁾.

2.8.2 Mausmodelle der Alzheimer Demenz

Die aggressivste Form der familiären Alzheimer Demenz (FAD) wird durch eine Mutation im *Presenilin 1 (Ps1)* Gen durch eine Leucin zu Prolin Mutation an Position 166 verursacht. Diese Veränderung führt bereits im frühen Alter zur Ausbildung einer Alzheimer Demenz. Manche Patienten erkranken schon im Alter von 24 Jahren. In transfizierten Zelllinien führte die PS1-L166P Mutation zu einer Erhöhung der A β 42-Konzentration im Verhältnis zu A β 40, über das Maß anderer untersuchter FAD Mutationen hinaus. Was darauf schließen lässt, dass dieses Verhältnis eine besondere Bedeutung in der Alzheimer Demenz Pathogenese einnimmt.

Aus diesen Erkenntnissen heraus wurde durch Radde *et al.* ⁽¹¹⁹⁾ ein neues Mausmodell generiert, welches das mutierte PS1 coexprimiert. Zusätzlich enthält dieses Modell ein KM670/671NL mutiertes Amyloid Precursor Protein (hAPP'schwedisch'), bei dem es sich ebenfalls um eine familiäre Mutation handelt, die erstmals in einer schwedischen Familie beschrieben wurde. Sowohl für das PS1, als auch für das APPswe Konstrukt wurde der Thy1 Promotor benutzt, um hohe transgene, Neuronen-spezifische Expressionsraten zu erzielen.

Um die genetische Variabilität zu minimieren wurden die transgenen Modelle in einen C57BL/6 Hintergrund generiert. Hinzu kommt das der C57BL/6 Mausstamm der am besten charakterisierte Stamm in Bezug auf die Neurobiologie des Alterns ist.

Genau betrachtet stellt das APP/PS1 Mausmodell kein Modell der Alzheimer Demenz im typischen Sinne dar. Es fehlen die Ausbildung von Tau-Pathologien und typische Neurodegenerationen, welche für die AD beschrieben werden. Vielmehr handelt es sich um ein Modell der zerebralen Amyloidose. In diesem aggressiven Modell beginnen die Akkumulationen bereits in einem Alter von 45 Tagen der Tiere, wobei im Verhältnis mehr humanes A β 42 im Vergleich zu A β 40 gebildet wird ⁽¹¹⁹⁾.

Bisherige Untersuchungen an Modellen der Alzheimer Demenz oder an ABC-Transporter defizienten Modellen weisen Defizite auf. So wurden Untersuchungen zu Transporteigenschaften verschiedener ABC-Transporter in Bezug auf A β oft unter Zuhilfenahme intrazerebraler Injektionen desselben durchgeführt ⁽⁸⁷⁾. Ebenso wurde wie bei Lam *et al.* auf Untersuchungen über einen längeren Zeitraum verzichtet und auch auf die Rückkreuzung der Tiere in einen einheitlichen genetischen Hintergrund wurde nicht geachtet ⁽¹²⁰⁾. Verschiedene Studien belegen jedoch, dass der genetische Hintergrund sowohl einen Einfluss auf die A β -Akkumulation nehmen kann ⁽¹²¹⁾, als auch, dass unterschiedliche genetische Hintergründe Einfluss auf die Expression der ABC-Transporter im Gehirn haben.

So konnte bereits im Jahr 2005 von Soontornmalai *et al.* ⁽¹²²⁾ beschrieben werden, dass eindeutige Expressionsunterschiede von ABC-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke der FVB/N und der C57Bl/6 Mausstämme vorliegen. Der Besatz der Blut-Hirn-Schranken ABC-Transporter beider Modelle unterscheidet sich dahingehend, dass ABCC2 in der BHS von Tieren des FVB/N Stammes nicht exprimiert wird.

Zur detaillierten Untersuchung der Entwicklung amyloider Ablagerungen in der Alzheimer Demenz Pathogenese über die Zeit und die Einflussnahme der ABC-Transporter wurden deshalb neue Mausmodelle des Typs APP/PS1 mit einem zusätzlichen Defizit für Membrantransporter (ABCB1, ABCC1 und ABCG2) in einem einheitlichen genetischen Hintergrund generiert ⁽¹²³⁾.

3. Zielstellung

Die Alzheimer Demenz entwickelt sich zunehmend zu einem gesellschaftlichen Problem. Einhergehend mit einer höheren Lebenserwartung, steigt die Anzahl der Betroffenen weltweit an. Diese Entwicklung wird sich in den nächsten 40 Jahren noch signifikant verschlechtern. Gleichzeitig stehen der Wissenschaft bisher keine effizient wirkungsvollen Medikamente zur Verfügung, welche den Verlauf und die Auswirkungen positiv beeinflussen.

Die Einflussnahme von ABC-Transportern der Blut-Hirn-Schranke auf die Alzheimer-Demenz Pathogenese konnte in den letzten Jahren zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Unter dieser Prämisse soll es Ziel der Arbeit sein, ein besseres Verständnis der ABC-Transporter ABCG2, ABCB1 und im Besonderen ABCC1 und ihrer Einflussnahme auf die Alzheimer Demenz Pathogenese zu erlangen, durch eine genaue Charakterisierung.

Ziel ist es außerdem, auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse Möglichkeiten zu finden und zu nutzen, welche neue potentielle Therapieoptionen aufzeigen, auf der Basis eines induzierten A β -Efflux'.

4. Material und Methoden

4.1 Tiermodelle

Transgene APP/PS1 Tiere ⁽¹¹⁹⁾ (genetischer C57B/6-Hintergrund) wurden von Mathias Jucker zur Verfügung gestellt (Hertie Institut, Universität Tübingen, Deutschland). Die Modelle FVB.129P2-Abcg2^{tm1Ahs} N7 (*Abcg2*^{-/-}), FVB129P2-Abcb1a^{tm1Bor} Abcb1b^{tm1Bor} N12 (*Abcb1*^{-/-}) und FVB.129P2-Abcc1a^{tm1Bor} N12 (*Abcc1*^{-/-}) wurden von der Firma Taconic Farms Inc. (Dänemark) bezogen ^(114, 124, 125).

Die transgenen APP/PS1-Mäuse werden mit dem jeweiligen ABC-Transporter Knockout-Modell über neun Generationen in einen einheitlichen genetischen FVB/N Hintergrund gekreuzt.

4.2 Tierhaltung

Alle Tiere werden in einem zwölf Stunden Tag/Nacht Rhythmus (mit einer Helligkeitsphase von 7Uhr bis 19Uhr) gehalten, mit freiem Zugang zu Wasser und Futter (Sniff). Die Haltung erfolgt in standardisierten Käfigen mit einem Besatz von maximal vier Tieren. Die Anzahl der Versuchstiere wird so gering wie möglich gehalten. Für die Durchführung der Behandlung mit Thiethylperazin als Therapieoption werden ausschließlich weibliche Tiere verwendet. Genehmigt werden alle Versuche auf Grundlage des Tierschutzgesetzes § 8, in der Fassung vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), mit letzter Änderung durch Artikel 20 vom 9.12.2010 (BGBl. I S. 1934), durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF): LALLF M-V/TSD/7221.3-2.3-004/06, LALLF M-V/TSD/7221.3-2.3-003/08, LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-004/11.

4.3 Behandlung der Versuchstiere mit Thiethylperazin

Die Tiere werden ab einem Alter von 55 Tagen bzw. 75 Tagen täglich geschlündelt. Dies erfolgt in beiden Gruppen bis zu einem Alter von 100 Tagen. Zur Behandlung werden ausschließlich weibliche Tiere verwendet. Es wird eine spezielle Schlündelsonde mit einem Durchmesser von 26 Gauge verwendet. Über das Maul wird die Sonde schmerzfrei in den Rachenraum (Pharynx) und anschließend über den Larynx unter Ausnutzung des

Schluckreflexes in den Ösophagus der Maus eingeführt. Die Thiethylperazin-Lösung wird dann direkt intragastral appliziert. Die Dauer dieser Applikation beträgt ca. fünf Sekunden und bedarf keiner Betäubung. Die intragastrale Applikation ermöglicht eine standardisierte Gabe von 15mg/kg Körpergewicht. Bei einer Fütterung über das Trinkwasser oder die Futterpellets ist die konstante Applikationsmenge nicht zu gewährleisten. Zudem erfolgt über diese Behandlungsart keine Schädigung der Tiere. Diese Applikationsmethode für die Nahrung wird routinemäßig auch bei Patienten mit Verschluckungsgefahr unter Verwendung einer Nasensonde genutzt und stellt hierbei selbst bei Dauerlage nur eine geringe Einschränkung dar. Als Belohnung bekommen die Mäuse anschließend einen Tropfen 5%ige Glucoselösung ins Maul.

4.4 Anzahlen der verwendeten Versuchstiere

Die Gesamtzahlen der verwendeten Tiere belaufen sich auf 145 Tiere einfach-defizienter Stämme, 111 Tiere mehrfach-defizienter Stämme, sowie 56 Thiethylperazin behandelte Tiere und 10 H₂O-behandelte Kontrolltiere.

Tabelle 2: Übersicht zu verwendeten Tierzahlen einfach-defizienter Mausstämmen.

| Genotyp | Anzahl der benötigten Tiere | | | | |
|------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 11w | 14w | 18w | 22w | 25w |
| APP/PS1-FVB | 9 | 9 | 4 | 7 | 6 |
| APP/PS1xABC $G2^{-/-}$ | 11 | 3 | 9 | 9 | 6 |
| APP/PS1xABC $B1^{-/-}$ | 8 | 5 | 3 | 7 | 8 |
| APP/PS1xABC $C1^{-/-}$ | 6 | 8 | 8 | 10 | 9 |

Tabelle 3: Übersicht zu verwendeten Tierzahlen mehrfach-defizienter Mausstämme.

| Genotyp | Anzahl der benötigten Tiere | | | | |
|--|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 11w | 14w | 18w | 22w | 25w |
| APP/PS1xABC B1 ^{-/-} xABC G2 ^{-/-} | 5 | 6 | 9 | 7 | 6 |
| APP/PS1xABC B1 ^{-/-} xABCC 1 ^{-/-} | 3 | 5 | 4 | 5 | 5 |
| APP/PS1xABCC 1 ^{-/-} xABC G2 ^{-/-} | 4 | 3 | 3 | 3 | 7 |
| APP/PS1x 3ABC ^{-/-} | 4 | 9 | 6 | 9 | 8 |

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Tierzahlen zur Thiethylperazin Behandlung.

| Genotyp | Beginn der Behandlung | Dosierung (je Tag) | Anzahl der benötigten Tiere |
|--|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| APP/PS1- FVB | 45d | 15mg/kg KG | 12 |
| | 75d | | 9 |
| APP/PS1xABCC 1 ^{-/-} | 45d | 15mg/kg KG | 4 |
| | 75d | | 5 |
| APP/PS1xABC B1 ^{-/-} xABC G2 ^{-/-} | 45d | 15mg/kg KG | 6 |
| | 75d | | 6 |
| APP/PS1- B6 | 45d | 15mg/kg KG | 8 |
| | 75d | | 6 |

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Tierzahlen, welche zur Kontrolle mit einer adäquaten Menge an H₂O behandelt worden sind.

| Genotyp | Beginn der Behandlung | Dosierung (je Tag) | Anzahl der benötigten Tiere |
|-------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| APP/PS1-FVB | 45d | 50µl | 5 |
| | 75d | | 5 |

4.5 Gewebepräparation

Alle Versuchstiere werden mittels zervikaler Dislokation euthanasiert und transkardial mit PBS perfundiert. Entnommen wird allen Versuchsmäusen das Großhirn, wobei eine Hemisphäre in 4% Paraformaldehyd überführt und vor Weiterbehandlung 24h gelagert wird, während die zweite Hemisphäre in flüssigem Stickstoff schockgefroren wird. Gelagert werden diese Hemisphären zur weiteren biochemischen Analysen bei -80°C.

4.6 ELISA (Enzyme-linked immunosorbant Assay)

Enzyme-linked immunosorbant Assays dienen der Quantifizierung spezifischer Proteine unter Zuhilfenahme selektiver Antikörper. Zur Quantifizierung von A β 40 und A β 42 (TH40HS, TK42HS: high sensitivity Kits; The Genetics Company; jetzt Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) werden ganze Hirn-Hemisphären, von welchen sowohl das Cerebellum, als auch der Hirnstamm auf Höhe des Mittelhirns entfernt werden, genutzt. Die, bei -80°C gelagerten Hemisphären werden mittels des PreCelly24 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) für 12 Sekunden bei 6.500rpm homogenisiert. Nach Zugabe von Carbonatpuffer (pH 8,0) und anschließender Mischung für fünf Sekunden bei 5.000rpm (PreCelly24; Peqlab, Deutschland) erfolgt eine 20minütige Zentrifugation (4°C, 24.000g) zur Separation löslicher und unlöslicher A β -Spezies. Der daraus gewonnene Überstand (Puffer-lösliche Fraktion) wird mit 8M Guanidin-Hydrochlorid, in einem Mischungsverhältnis von 1:1,6, versetzt. Das entstandene Pellet wird mit dem 8fachen Volumen an 5M Guanidin-Hydrochlorid gemischt, bei Raumtemperatur für drei Stunden geschüttelt und anschließend nochmals für 20 Minuten zentrifugiert (4°C, 24.000g). Der so erhaltene Überstand repräsentiert die Guanidin-lösliche

Fraktion. Die Gesamtprotein-Gehalte aller erhaltenen Proben werden mittels NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) ermittelt. Die Durchführung des eigentlichen ELISAs erfolgt in Doppelbestimmung für jede gemessene Probe nach genauen Vorgaben der Gebrauchsanweisung und unter Verwendung der mitgelieferten Lösungen und Antikörper. Die Messungen werden mit einem Mikrotiterplatten-Reader (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei einer Absorption von 420nm durchgeführt.

Carbonat Puffer (pH 11.5)

100mM Na₂CO₃

50mM NaCl

- Mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen
- Proteaseinhibitor (vor Gebrauch zugeben)
- bei 4°C lagern

5M Guanidin-Hydrochlorid (pH 8.0)

5M Guanidin/HCl

50mM Tris/HCl

- Mit ddH₂O auf 50 ml auffüllen
- bei 4°C lagern

8M Guanidin-Hydrochlorid (pH 8.0)

8,2M Guanidin/HCl

82mM Tris/HCl

- mit ddH₂O auf 50 ml auffüllen
- bei 4°C lagern

4.7 Immunhistochemie

4.7.1 A β und NeuN Färbungen

Für Immunhistochemische Analysen werden Formalin-fixierte Hirnhemisphären zunächst in Paraffin eingebettet und 4 μ m Dünnschnitte durch den Hippocampus angefertigt (Position - Bregma: 1,5mm bis 2,5mm). Die erstellten Schnitte werden mittels Xylol entparaffiniert und im Anschluss automatisiert mit dem BondMaxTM Autostainer-System (Leica Microsystems GmbH Menarini, Wetzlar, Deutschland) gefärbt. Initiiert wird die Färbung nach jeweils

5minütigem Blocken endogener Peroxidase und dem Epitop-Retrieval mit 95%iger Ameisensäure. Primäre Antikörper (A β - Dako Klon 6F3D: 1:100; NeuN – Millipore clone MAB377: 1:1000) werden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion der Antikörper erfolgt unter Zuhilfenahme des BondMaxTM Refine Detection Kits unter Anwendung des Standard Protokolls DAB R30 ⁽⁶⁵⁾.

Um eine einheitliche Auswertung der Schnitte zu erzielen, werden diese vollständig mit Hilfe des MiraxDesk/Mirax Midi Scanners mit einer Auflösung von 230nm digitalisiert und semiautomatisch mit Hilfe der Axiovision Software (Zeiss Microsystems GmbH, Jena, Deutschland) ausgewertet. Zur Analyse dienen ausschließlich kortikale Plaques. Hierzu wird eine ROI (Region of Interest) festgelegt, welche nicht-kortikale Regionen von vornherein ausschließt. Nach ihrem RGB-Profil getrennt, können sowohl die Größe, als auch die Anzahl und die jeweilige Dichte der Plaques bestimmt werden. Aus diesen Analysen ergeben sich zusätzliche Daten zur kortikalen Plaquebedeckung ⁽¹²⁶⁾. Um eine einheitliche Auswertung zu gewährleisten, werden die erhaltenen Daten auf eine Kortexfläche von 10mm² normiert, um Unterschiede in der bestimmten ROI-Fläche auszugleichen.

4.7.2 Iba/A β Doppelfärbung

Hirne zur Doppelfärbung von Iba/A β erhalten die gleiche Aufarbeitung, wie unter 4.7.1 beschrieben. Die gewonnenen Schnitte werden anschließend mit 98%iger Ameisensäure vorbehandelt und nacheinander für 30min mit den primären Antikörpern inkubiert. Immunhistochemisch gefärbt werden sie mit A β (A β - Dako Klon 6F3D: 1:200) und dem Farbstoff BondMaxTM Polymer AP-Red Detection Kit (red color, Leica, Deutschland), zur Darstellung der amyloiden Plaques in rot. Sowie Iba1 (Anti – Iba1, Wako Klon: 1:1000) und dem Farbstoff BondMaxTM Polymer AP-Refine Detection Kit (brownish color, Leica, Deutschland) zur Darstellung der Mikroglia in braun. Zur Digitalisierung werden sämtliche angefertigte Schnitte mit Hilfe des Mirax Mini/Medi Slide Scanners (Zeiss Microsystems GmbH, Jena, Deutschland) gescannt. Wiederum erfolgt die semiautomatische Auswertung mit Hilfe der AxioVision Software, durch die Festlegung der ‚Region of Interest‘, sowie der Bestimmung der Anzahl und Größe der Plaques und Mikroglia nach ihrem RGB-Profil unter Zuhilfenahme des jeweiligen Farbkanals: Grün für die DAB-gefärbten Mikroglia und rot für AP-Red gefärbten amyloiden Plaques. In Anlehnung an die jeweilige Form und Größe der gemessenen Plaques wird digital automatisiert ein Rechteck über jeden Plaque gespannt und im Anschluss die von Mikroglia bedeckte Fläche innerhalb des Rechteckes um den Plaque herum bestimmt. Die erhaltenen Daten können so nicht nur Auskunft über

Plaquantzahl, Plaquantgröße und kortikale Plaquantbedeckung geben, sondern auch über die mikrogliale Fläche und die prozentuale Plaquantfläche, welche von Mikroglia bedeckt ist. Im Anschluss werden sämtliche Daten für eine einheitliche Darstellung auf eine Kortexfläche von 10mm² normiert, um Unterschiede in der manuell bestimmten ROI-Fläche auszugleichen (126, 127).

4.8 ECTA (Endothelial Cell Transwell Assay)

4.8.1 Gliazellpräparation

Zur Präparation werden die Großhirne von fünf Tieren in einem maximalen Alter von 3 Tagen verwendet, welche nach Euthanasierung und Gehirnentnahme in Basalmedium gelagert werden. Im Anschluss erfolgt die Entfernung des Cerebellums, des Hirnstammes, des Bulbus olfactorius und der Meningen. Das Gewebe wird dann unter Zuhilfenahme einer 80µm Membran (Sefar AG, Heiden, Schweiz) durch vorsichtiges Ausstreichen gefiltert und in 5ml Gliazell-Kulturmedium aufgenommen. Ausgesät werden die Zellen in einer Konzentration von 120.000 Zellen/ml auf Poly-D-Lysin gecoateten Platten und bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert.

L-Glutamin

200mM L-Glutamin

- mit ddH₂O auf 50 ml auffüllen
- sterilisieren mittels eines Filters (Porengröße: 0,22µm)
- bei -20°C lagern

Basalmedium

10g Basalmedium-(Pulver)

- mit ddH₂O auf 1000ml auffüllen
- 2g NaHCO₃ pro Liter hinzufügen
- sterilisieren mittels eines Filters (Porengröße: 0,22µm)

Gliazell-Kulturmedium

10% fetales Kälber Serum

1% 200mM L-Glutamin

0,5% 10ng/ml Gentamycin

- mit Basalmedium auf 500ml auffüllen

4.8.2 Präparation von Kapillarendothelien

Gewonnen werden die Kapillarendothelien aus 3-4 Wochen alten Mäusen und mittels des Prinzips von Coisne *et al.* ⁽¹²⁸⁾ aufgearbeitet. Es erfolgt nach Entnahme des gesamten Hirns die Entfernung des Hirnstammes, des Marklagers und der Meningen und die anschließende Homogenisierung des Gewebes mit dem zweifachen Volumen des Waschpuffers B (WBB) in einem 15ml Douncer (WHEATON Industries, Millville (NJ), USA). Hinzugefügt wird dann das einfache Volumen 30%iger Dextran-Lösung zum Homogenat mit zwei sich anschließenden Zentrifugationsschritten (25min, 3000g, 4°C). Das entstandene Pellet enthält die benötigten Gefäße, diese werden durch erneutes Pipettieren wieder in WBB gelöst. Die folgende Vakuum Filtration durch eine 60µm Membran (Sefar AG, Heiden, Schweiz) dient der Separierung der Kapillaren von größeren Gefäßen. Nach einer Behandlung mit Collagenase/Dispase und eines erneuten Pipettierschrittes wird die Einzelzell-Suspension auf Matrigel gecoateten Transwell Inserts (Porengröße 0,4µm; Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) in einer Konzentration von 340.000 Zellen pro Insert ausgesät und auf einer unterstützenden Gliazell-Kultur kultiviert.

Waschpuffer A (WBA)

500ml HBSS (ohne NaHCO₃)

5,05ml Hepes Puffer

Waschpuffer B (WBB)

505,5ml WBA

→ 6,67ml entfernen

→ Zugabe von 6,67ml BSA Lösung (7,5%)

Dextran-Lösung (30%)

90g Dextran

→ mit 300ml WBA auffüllen

→ autoklavieren

→ bei 4°C lagern

→ Herstellung der Arbeitslösung aus 50ml Dextran-Lösung mit 667µl BSA (7,5%)

TLCK Lösung

16mg TLCK

→ in 10,88ml WBA aufnehmen

→ sterilisieren mittels eines Filters (Porengröße: 0,22µm)

Enzym-Lösung (pro 10 Mäuse)

2,7ml WBB

3µl DNaseI Lösung (10mg/ml)

3µl TLCK Lösung (147µg/ml)

→ 300µl Collagenase/Dispase (10mg/ml) frisch hinzufügen

Endothel Kulturmedium

20% Kälber Serum

1% 20mM L-Glutamin

1% Vitamine 100x

2% Aminosäuren 50x

0,5% Gentamycin

→ mit DMEM auf 500ml auffüllen

→ Wachstumsfaktor bFGF (1ng/ml) frisch dazugeben

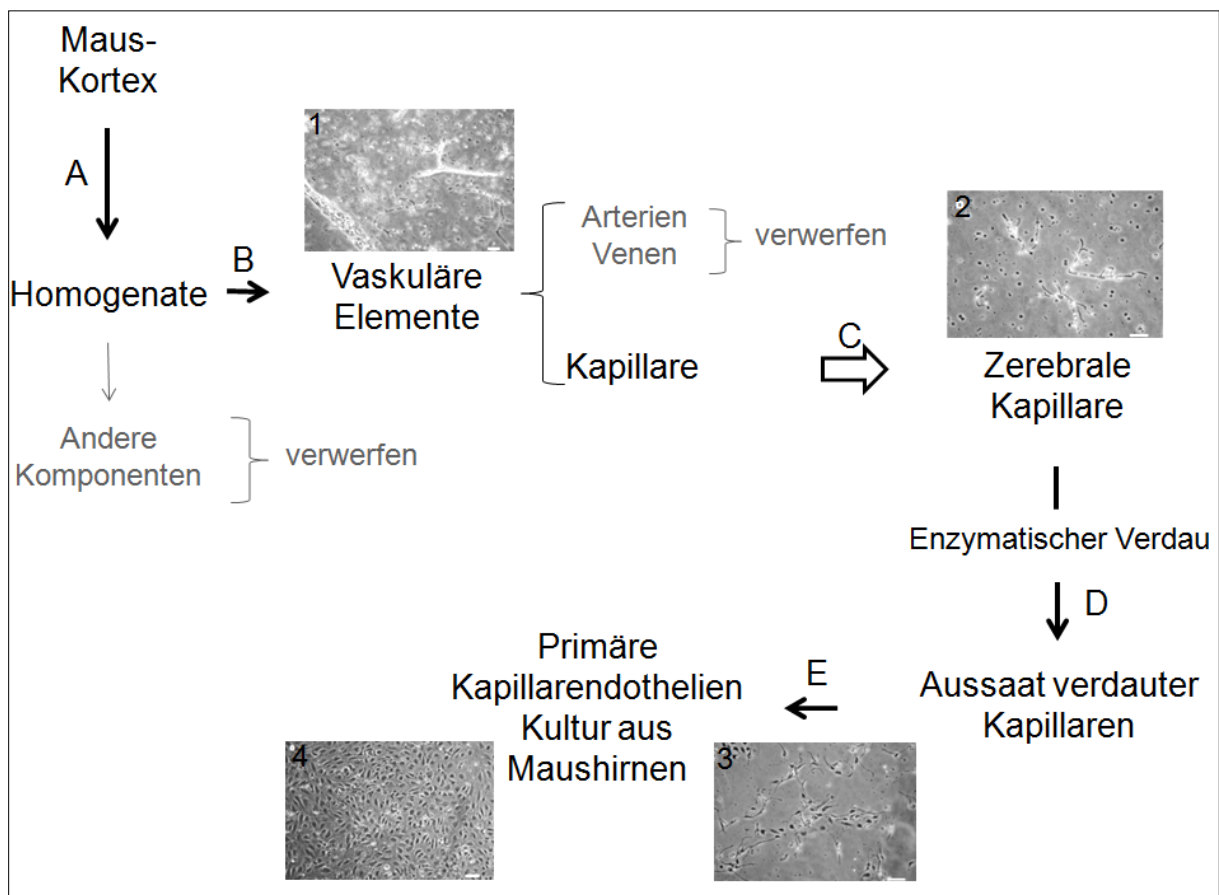


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Isolation von Kapillarendothelien aus Maushirnen. (A). Homogenisation nach Entnahme entsprechender Mauskortices. **(B)** Vaskuläre

Elemente (Bild 1) bleiben nach Homogenisation erhalten, Zellreste werden verworfen. (C) Durch Filtration erfolgt die Isolation zerebraler Kapillaren (Bild 2) und die Entfernung der Arterien und Venen. (D) Verdau zerebraler Kapillaren zur Zerstörung der Basalmembran und der Tight junctions und der Isolation kapillarer Endothelien. (E) Aussaat kapillarer Endothelien und Ausbildung einer einheitlichen Zellschicht (Bild 3 nach 24h; Bild 4 nach fünf Tagen). Bildeinfügungen Phasenkontrastaufnahmen, Maßstab: 50µm. (Adaptiert von Coisne *et al.* ⁽¹²⁸⁾).

4.8.3 ECTA Durchführung

Die Durchführung des ECTAs (Endothial cell transwell Assay) erfolgt unter Zugabe von 10ng (Endkonzentration 1,6nM) Aβ42 pro Well und Testung der transportierten Menge desselben nach 30, 60 und 120 Minuten, sowie nach weiteren 6 und 24 Stunden von der abluminalen (Gehirn) zur luminalen (Blut) Seite. Die Gehalte des transportierten Aβ42 werden mittels ELISA erhoben. Die Dichte und Permeabilitätsrate der Zellen wird durch Lucifer Yellow, einem Farbstoff, der nicht aktiv über ABC-Transporter transportiert wird, geprüft. Die P_e Kalkulation des parazellulären Durchflusses während des Assays wird nach Silfinger-Birnboim *et al.* bestimmt ⁽¹²⁹⁾. Das durchschnittlich transportierte Volumen wird gegen die Zeit aufgetragen und der Anstieg durch lineare Regression bestimmt. PS ist die Permeabilitätsrate der gesamten Fläche des Inserts (in ml/min), und der berechnete Anstieg entspricht dabei PSt. Der Anstieg der Transportrate eines Kontrollinserts (Matrigel gecoateter Filter ohne Zellen) wird ebenfalls bestimmt und als PSf bezeichnet. Der PS Wert für die endotheliale Zellschicht (PSe) wird folgendermaßen berechnet: $1/PSe = 1/PSt - 1/PSf$. Der erhaltene Wert für PSe wird anschließend durch den Wert der Insert-Fläche ($AO=1,13cm^2$) dividiert, um die endotheliale Permeabilitätsrate (Pe in cm/min) zu erhalten. Gemessene Inserts mit einem Pe Wert höher als $1.6 \times 10^{-3} cm/min$ werden verworfen und für die Aβ42 Transportanalysen nicht genutzt. Der aktive Aβ42-Transport wird anschließend über die Formel $C_{A\beta} \times V_{lc} \times (1-(C_{lm}/C_{Li}))$ ermittelt. Um den parazellulären Fluss zu kontrollieren, werden $C_{A\beta}$ und V_{lc} dabei auf die gemessene Aβ42-Konzentration und das Volumen des Inserts bezogen. C_{lm} entspricht in der Rechnung der Menge an Lucifer Yellow, welche die Zellschicht des Transwells passiert und C_{Li} entspricht der initial eingesetzten Menge an Lucifer Yellow.

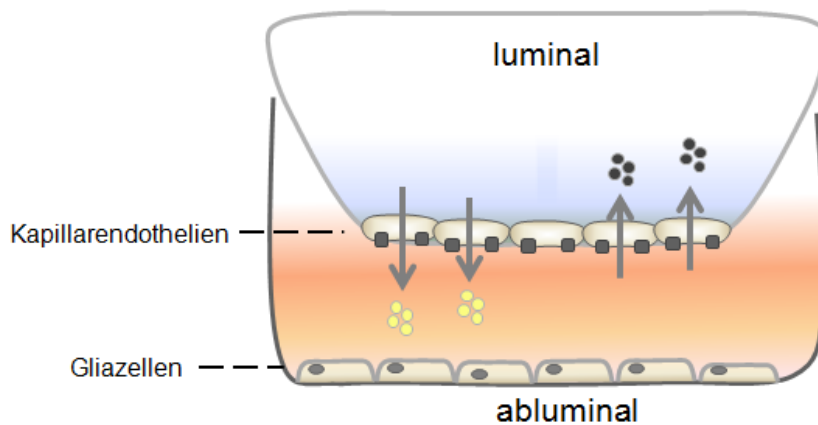


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines *in vitro* Blut-Hirn-Schranken Modells. (Grafik mit freundlicher Genehmigung adaptiert von J. Pahnke).

4.9 RNA Isolation

Die Isolation von RNA erfolgt mittels TRIzol, wobei pro 100mg Hirngewebe 1ml TRIzol verwendet wird. Nach der Homogenisation werden pro Milliliter TRIzol 200µl Chloroform zugegeben und nach der Zentrifugation (12.000g, 15min, 4°C) die obere wässrige Phase abgenommen und mit 500µl Isopropanol versehen. Das Gemisch wird 15min bei RT inkubiert und anschließend nochmals zentrifugiert (12.000g, 15min, 4°C). Das entstehende RNA Pellet wird mehrfach mit 75%igem Ethanol gewaschen und getrocknet, bevor es in DEPC H₂O aufgenommen wird (1µl DEPC H₂O pro 1mg Hirngewebe).

DEPC H₂O

1000ml H₂O

0,01% DEPC

→ ÜN bei RT rühren lassen

→ autoklavieren

4.10 Microarray

Hierzu werden APP/PS1-, APP/PS1xABCC1^{-/-}- und APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-}-Tiere in einem Alter von 100 Tagen euthanasiert, die entnommenen Hirne sauber vom Cerebellum getrennt, schockgefrostet und anschließend enthaltene RNA mittels TRIzol isoliert. Zur

eigentlichen Expressionsanalyse genutzt worden, sind GeneChip Mouse Gene 1.0 Arrays (Affymetrix, Santa Clara (CA), USA), welche in der Lage sind mehr als 28.000 Gene zu untersuchen. Die Array Hybridisierung wird nach Anleitung der verwendeten Kits durchgeführt (Ambion WT Expression Kit (Ambion, Kaufungen, Deutschland), The GeneChip WT Labeling and Hybridisierungs Kits und The GeneChip Sample Cleanup Module (Affimatrix, USA)). Zur Signalverstärkung wird ein biotinylierter Antistreptavidin Antikörper (Vector Laboratories, Servion, Schweiz), welcher mit goat IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis (MO), USA) vernetzt wurde, amplifiziert. Gefolgt von einer Sekundärfärbung mit Streptavidin-Phycoerythrin Konjugat (Molecular Probes; Invitrogen, Karlsbad (CA), USA). Gescannt werden die Microarrays anschließend mit Hilfe des G7 upgraded GeneChip Scanners 3000 (Affimatrix, USA) mit einer Auflösung von 0,7 micron. Die Auswertung der Daten erfolgt mit Hilfe der Partek Geneomics suite 6.5 Software (Partek, St. Louis (MO), USA) unter Zuhilfenahme des Robust Multichip Aanalysis (RMA) Algorithmus, einschließlich eines GC-Gehalts Abgleich (GCRMA). Hierbei wird die Expressionsanalyse im Vergleich von jeweils zwei Gruppen vorgenommen (ANOVO Group, Deutschland), wobei je Gruppe mindestens drei biologische Replikate zur Verfügung stehen müssen. Abgelegt werden die erhaltenen Daten im NCBI Gene Expression Omnibus (GEO GSE30762).

4.11 Western Blot

Für Western Blot Analysen sind sämtliche Proben nach Lesné *et al.* aufgearbeitet ⁽⁸⁰⁾ worden. Die Protein Konzentrationen wird mittels eines BCA-Assays (Pierce, Thermo Fischer Scientific; Rockland, USA) nach Anleitung vorgenommen. Nach Elektrophorese von jeweils 10µg Protein pro Lauflinie (Einlaufen der Proben für 30min bei 80V und anschließend 90min bei 100V), werden die Proteine 2h bei 50V auf eine PVDF Membran geblottet. Nach einstündigem Blocken in 5% Milchpulver bei Raumtemperatur erfolgt die Inkubation der Primärantikörper (ABCG2 (1:1000; Alexis Biochemicals, Lörrach, Deutschland), ABCB1 (1:500; D-11, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (CA), USA), ABCC1 (1:200; Alexis Biochemicals, Deutschland), APP/Aβ (1:1000; clone 6E10; Sigma-Aldrich, USA), ADAM10 (1:1000; Calbiochem, jetzt Merck Millipore, Deutschland), BACE1 (1:1000; Abcam, Cambridge, Großbritannien), IDE (1:500; Abcam, Großbritannien), sowie β-Actin (1:20000; Sigma-Aldrich, USA)). Die Inkubation der Sekundärantikörper (anti-mouse-HRP, anti-rat-HRP und anti-rabbit-HRP in der jeweiligen Verdünnung von 1:2500) erfolgt über 1h bei Raumtemperatur. Zur Detektion und Visualisierung wurden das ECL Plus Detection Kit (Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) und eine Roper CoolSnap HQ2 Kamera (Roper Scientific Germany, Martinsried, Deutschland) genutzt.

Protein Extraktionspuffer I

150mM NaCl

2mM EDTA

1mM PMSF

20% SDS

0,01% Igepal A630

100mM Tris/HCl

→ Mit ddH₂O auf 30ml auffüllen

→ Proteaseinhibitor (vor Gebrauch zugeben)

→ bei 4°C lagern

Protein Extraktionspuffer II

150mM NaCl

100mM Tris/HCl (pH 7,6)

0,1% Triton X-100

→ Mit ddH₂O auf 30ml auffüllen

→ bei 4°C lagern

Protein Extraktionspuffer III

100mM TrisHCl (pH 7,6)

150mM NaCl

1mM EDTA

1mM PMSF

3% 20%iges SDS

0,5% Triton X-100

1% Deoxycholat

→ Mit ddH₂O auf 30ml auffüllen

→ Proteaseinhibitor (vor Gebrauch zugeben)

→ bei 4°C lagern

1x Laufpuffer

0,025M Tris

0,192M Glycin

0,1% SDS

→ Mit ddH₂O auf 1000ml auffüllen

10x Blotpuffer

250mM Tris

1920mM Glycin

→ Mit ddH₂O auf 1000ml auffüllen

→ bei 4°C lagern

1x Blotpuffer

100ml 10x Blotpuffer

20% Methanol

→ Mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen

→ bei 4°C lagern

10x TBS Puffer

50mM Tris

1,5M NaCl

→ Mit ddH₂O auf 1000ml auffüllen

→ pH auf 7,4 mit HCl einstellen

1xTBST Puffer

100ml 10x TBS

0,01% Tween20

→ Mit ddH₂O auf 1000ml auffüllen

4.12 ABCC1 Aktivitätsassay

Zur Messung der ABCC1 Aktivität *in vitro* werden Membran-Präparationen von Sf9-Zellen genutzt und mittels des SB MRP1 PREDEASY ATPase Kit (Solvo Biotechnology USA Inc., Boston, USA) nach Gebrauchsanweisung gemessen. Hierzu werden die Sf9-Zellen, welche humanes ABCC1 enthalten, in Assay Puffer gelöst, um eine Konzentration von 8µg Membran pro gemessenem Well zu erreichen. Als Standard Substrat der Messungen dient NEM-GS. Vanadat wird als Kontrolle für unspezifische ATPase Aktivität eingesetzt. Thiethylperazin wird für die Messungen in DMSO (Sigma-Aldrich, USA) gelöst und den zu untersuchenden Wells zugesetzt in einer Endkonzentration von 1,3ng/ml. Sämtliche Pipettierarbeiten sind auf Eis durchzuführen. Nach Zugabe des Thiethylperazins erfolgt eine 10minütige Inkubation bei 37°C. Startpunkt der Reaktion ist die Zugabe von 10µl 10M MgATP. Durch die Zugabe von 100µl Entwickler wird diese Reaktion nach 10min

abgestoppt. Nach weiteren 2min werden 100µl Blocklösung zugeführt und nochmals bei 37°C für 30min inkubiert. Die Messungen der 96-Well Platten erfolgen mittels des Paradigm Spectrophotometers (Beckman-Coulter Deutschland, Krefeld, Deutschland) bei 610nm.

4.13 Verhaltensanalysen

4.13.1 *Watermaze*

Das Morris Watermaze dient der konkreten Prüfung der Gedächtnisleistung und des räumlichen Lernverhaltens von Versuchstieren. Es werden hauptsächlich hippocampale Bereiche des Gehirns aktiviert, welche für die räumliche Orientierung und für die Überführung von Gedächtnisinhalten vom Kurz- ins Langzeitgedächtnis verantwortlich sind⁽¹³⁰⁾. Die Apparatur besteht aus einem Becken mit eineinhalb Metern Durchmesser, welches mit 20°C kaltem Wasser gefüllt wird. Wärmeres Wasser schützt vor Hypothermie, kann aber den Lernprozess beeinflussen, da es den Willen der Tiere die Plattform ausfindig zu machen behindern kann. Ziel des angelegten Versuchs ist es, eine für die Mäuse nicht sichtbare Plattform zu finden, welche sich knapp unterhalb der Wasseroberfläche befindet. An vier sich jeweils gegenüberliegenden Punkten außerhalb des Beckens werden visuelle Orientierungspunkte angebracht. Sie dienen den Tieren dazu, die Plattform, welche in ihrer Position nicht verändert wird, in einen räumlichen Zusammenhang zu bringen. Die Testung der Tiere erfolgt an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils vier Versuchen in zwei Sitzungen, welche einen Abstand von vier Stunden zueinander haben. Jeder Tag beinhaltet zudem ein erstes 30sekündiges Gewöhnungsschwimmen mit sichtbarer Plattform, dies dient der Willensstärkung der Tiere. Die zeitliche Vorgabe für das Finden und Erreichen der Plattform beträgt 60 Sekunden. Ist die Maus in dieser Zeit nicht in der Lage die Plattform selbstständig zu finden, so wird sie ihr gezeigt. Der aussagekräftigste, gemessene Parameter ist die Zeit bis zum Finden der Plattform, da er direkt das Lernverhalten bzw. den Lernerfolg der Tiere dokumentiert (Methode adaptiert von⁽¹³¹⁾).

4.13.2 *Y-Maze*

Die Y-Maze^(132, 133) Versuchsanordnung besteht aus drei geschlossenen, symmetrischen, d.h. jeweils in einem Winkel von 120° zueinander ausgerichteten Armen, identischen Aufbaus und Größe (325mm Länge und 85mm Breite und 150mm Höhe). Mittels des Y-Maze können Effekte des Thiethylperazins auf kognitive Defizite in behandelten, transgenen AD-Mäusen

quantifiziert werden. Der Test zielt darauf ab, den Willen der Versuchstiere neue Umgebungen zu erkunden, aufzuzeigen, was ein typisches Verhalten bei Nagetieren darstellt. Hierbei werden verschiedene Regionen des Gehirns wie z.B. der Hippocampus und der präfrontale Kortex aktiviert. Neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer Demenz können sich negativ auf das Erkundungsverhalten der Tiere auswirken, da sie unter anderem die angeführten Bereiche des Gehirns betreffen. Der einmalig durchgeführte Y-Maze Versuch dauert fünf Minuten. Es gibt keine vorangegangenen Gewöhnungsphasen. Die Mäuse werden in die Mitte der Plattform gesetzt, mit freiem Zugang zu allen Armen. Infrarot Sensoren bestimmen die besuchten Arme, sobald die Maus sich vollständig in einem dieser befindet. Gemessen werden neben der Geschwindigkeit und der zurückgelegten Strecke vor allem die Anzahl der besuchten Arme, sowie ihre Reihenfolge und die damit verbundenen Alterationen. Komplette Alterationen zeichnen sich durch den aufeinanderfolgenden Besuch aller Arme aus, endend mit einem erneuten Besuch des ersten Armes (A, B, C, A). Die Auswertungen erfolgen unter Zuhilfenahme der *VideoMot* Software (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland).

Ein aussagekräftiger Parameter zur Beurteilung einer beeinflussten Kognition in behandelten APP/PS1-Mausmodellen ist die wiederholte Begehung desselben Arms. Dieser Parameter trifft eine Aussage darüber, ob Tiere in der Lage sind sich an den eben begangenen Arm zu erinnern und dient damit der Beurteilung der Funktion des Kurzzeitgedächtnisses. Gleichzeitig kann die Einflussnahme von Begleiterscheinungen, wie Depressionen, die vermehrt bei fortschreitenden, neurodegenerativen Erkrankungen auftreten, untersucht werden. Denn diese können das Verhalten der Tiere ebenso nachhaltig beeinflussen, wie die eigentliche Haupterkrankung.

4.14 Statistische Auswertungen

Die Auswertung der erhaltenen ELISA Werte erfolgt zunächst mit Hilfe des Lilliefors goodness-of-fit test (Kolmogoroff-Smirnow-Lilliefors test) ($\alpha = 0,05$). Dieser dient der Bewertung der Daten hinsichtlich ihrer Verteilung. Auf Grund der erhaltenen Analysen wird davon ausgegangen, dass die Werte nicht normal, sondern logarithmisch-normal verteilt sind. Auf Grundlage dessen werden sowohl die Durchschnittswerte, als auch die Konfidenzintervalle nach log-normal Kriterien berechnet.

Die Ergebnisse der ELISA und IHC Daten werden als Mittelwerte + Standardfehler der Mittelwerte dargestellt. Der Wilcoxon rank-sum Test dient der statistischen Bewertung. Es werden jeweils die erhaltenen Daten der Mausstämme und der einzelnen Zeitpunkte miteinander, auf statistisch signifikante Differenzen, verglichen.

Die Ergebnisse der Verhaltensanalysen werden wiederum als Mittelwerte + SEM dargestellt. Die Analyse statistisch signifikanter Differenzen erfolgt erneut mit dem Wilcoxon rank-sum Test.

Für alle statistischen Tests werden Unterschiede von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

5. Ergebnisse

5.1 Expressionsanalyse und Lokalisation der ABC-Transporter

Vor Analysen zur Einflussnahme der ABC-Transporter auf die AD-Pathogenese und die Auswirkungen bestimmter Transporter-Defizite auf die Entwicklung dieser, erfolgen Expressions- und Lokalisationsanalysen. Hierzu durchgeführte Western Blot Analysen, mit einer eingesetzten Gesamtmenge von 15µg Protein pro Probe zeigen, dass der Besatz und die Verteilung von ABC-Transportern im Gehirn stark variierten, in dem von uns genutzten AD-Mausmodell. Actin als Ladekontrolle dient der Überprüfung äquivalent eingesetzter Proteingesamtmengen. Interessanter Weise kann nachgewiesen werden, dass der Transporter ABCG2 sowohl an der Blut-Hirn-Schranke, als auch an der Blut-CSF-Barriere stark exprimiert wird. Während ABCB1 überwiegend an der Blut-Hirn Schranke exprimiert wird, scheint der Transporter ABCC1 hauptsächlich im Plexus choroideus angesiedelt zu sein. An der Blut-Hirn-Schranke beträgt seine Expression 9% der des Transporters ABCB1 (s. Abb. 7).

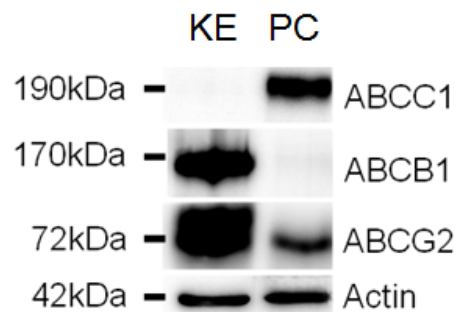


Abbildung 7: Expressionsanalyse und Lokalisation von ABCB1, ABCC1, sowie ABCG2 in Kapillarendothelien (KE) und Epithelzellen des Plexus choroideus (PC). Western Blot Analysen mit einer eingesetzten Gesamtmenge Protein von 15µg zeigen, dass ABCC1 hauptsächlich im PC lokalisiert ist, während ABCB1 überwiegend in den KE zu finden ist. Die relative Expressionsrate von ABCC1 in den KE beträgt lediglich 9% gegenüber ABCB1. Die ABCG2 Expression erfolgt sowohl in den Kapillarendothelien, als auch im Plexus choroideus. Actin dient als Ladekontrolle für die verwendeten Gesamtproteinmengen. (M. Krohn und C. Lange *et al.* ⁽¹²³⁾).

5.2 APP/PS1 ABC-Transporter defiziente Mausmodelle

Für die vorgelegten Studien zur Einflussnahme von ABC-Transportern auf die AD-Pathogenese und die Entwicklung der A β -Akkumulation ergeben sich folgende Analysen, unter Verwendung neuer, von uns generierter Mausmodelle der Alzheimer Demenz. Detaillierte Analysen erfolgen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten, zwischen 11 und 25 Wochen, (11, 14, 18, 22 und 25 Wochen), welche ein genaues Bild der Entwicklung amyloider Akkumulationen ergeben sollen.

5.2.1 Immunhistochemische Untersuchungen APP/PS1 ABC-Transporter defizienter Mausmodelle

Zunächst werden die Tiere auf histopathologische Unterschiede in Bezug auf ihre A β -Akkumulation untersucht. Die Resultate zeigen, dass APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tiere einen stark signifikanten Anstieg in der Anzahl und Größe der, im Kortex bestimmten, Plaques verzeichnen im Vergleich zu gleichaltrigen APP/PS1-Kontrollen. So ist die kortikale Plaquebedeckung im Vergleich zu den Kontrollen um 75% erhöht in einem Alter von 25 Wochen. Gleichzeitig steigt die Größe der gemessenen Plaques um 34% an, was durch die Zunahme vor allem großer Plaques über 700 μm^2 um 63% und der Abnahme kleiner Plaques unter 400 μm^2 um 24% zu erklären ist (s. Abb. 8A-C). Auch über die gesamte gemessene Zeitspanne lässt sich nachweisen, dass APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tiere bereits zu frühen Zeitpunkten erhöhte Ablagerungsraten aufweisen.

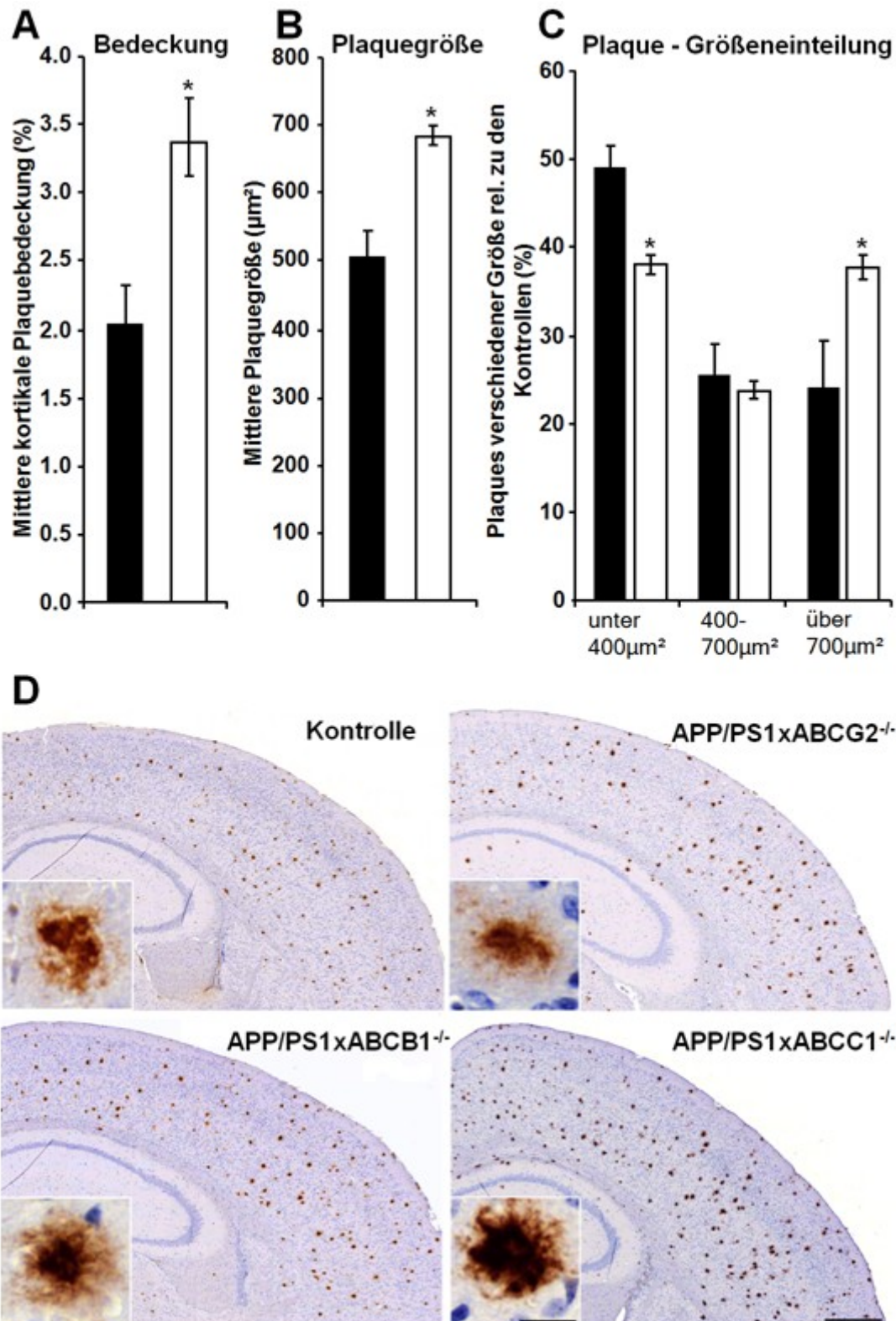


Abbildung 8: ABCC1-Defizit fördert die A β -Ablagerungsraten. (A) Die kortikale Plaquebedeckung ist in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren (weiße Balken) um 75% erhöht im Vergleich zu gleichaltrigen APP/PS1-Kontrollen (schwarze Balken). (B) Die Plaquegröße ist im Vergleich zu den Kontrollen um 34% erhöht, ursächlich hierfür ist (C) die Zunahme großer Plaques über 700µm² um 63% und die Abnahme der kleinen Plaques unter 400µm² um 24%. Fehlerbalken zeigen SEM. (n≥3; *P<0,05). (D) Immunhistochemische Färbungen von 25 Wochen alten APP/PS1xABCG2^{-/-}, APP/PS1xABCB1^{-/-}, APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren und den dazugehörigen APP/PS1-Kontrollen zeigen eine größere

kortikale A β -Bedeckung in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren. Typische Plaques ähnlicher Größe sind als zusätzliche Einfügung dargestellt. Anti-A β (6F3D) Färbung. Maßstab 500 μ m (Einfügung 50 μ m). (M. Krohn und C. Lange *et al.* ⁽¹²³⁾).

Vergleichbare Entwicklungen sind für die untersuchten APP/PS1xABCG2^{-/-}-Modelle nicht nachweisbar. So zeigt sich, dass sich die A β -Ablagerungsraten der APP/PS1xABCG2^{-/-}-Tiere zu allen Zeitpunkten auf gleichem Niveau mit den Kontrollen bewegen (s. Abb. 9). APP/PS1xABCB1^{-/-}-Tiere zeigen einen zunehmenden Anstieg, jedoch nicht in gleichem Maße wie APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tiere. In APP/PS1xABCB1^{-/-}-Mäusen sind interessanterweise zu bestimmten, gerade frühen Zeitpunkten (14 bis 18 Wochen) Erhöhungen in den Plaquesgrößen im Vergleich zu den Kontrollen zu verzeichnen, welche sich zusätzlich in einer signifikanten Erhöhung der kortikalen Plaquesbedeckungsrate (im Alter von 14 Wochen) bemerkbar macht (s. Abb. 9A). Im weiteren Verlauf kann jedoch kein weiterer rapider Anstieg verzeichnet werden. So dass bis zum Alter von 25 Wochen in der Langzeitkinetik zwar Anstiege in der kortikalen Plaquesbedeckung zu verzeichnen sind, diese aber nicht in gleichem Maße wie in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren auftreten (s. Abb. 9C).

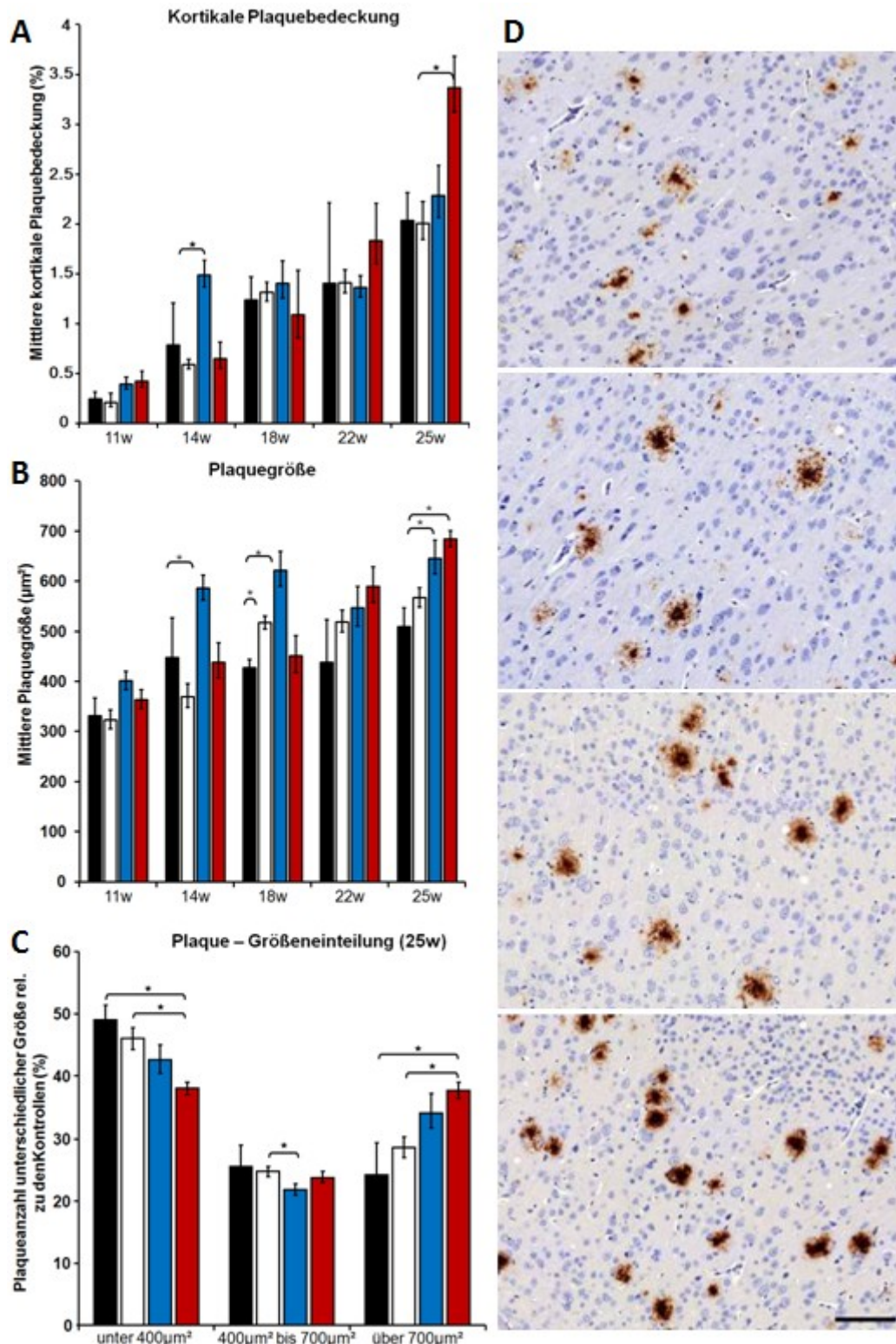


Abbildung 9: Quantifizierung amyloider Ablagerungen unter Verwendung immunhistochemischer Analysen. (A und B) Die kortikale Plaquebedeckung und Größe der Plaques ist in bestimmten ABC-Transporter defizienten Stämmen signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. (A) APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tiere (rote Balken) weisen die höchsten Ablagerungsraten auf. (B) Die Größe der Plaques ist in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren und in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren (blaue Balken) signifikant erhöht in einem Alter von 25 Wochen. (C) Die Zunahme der Gesamtgröße der Plaques steht in direktem Zusammenhang mit der Abnahme der kleinen Plaques (<400µm²) bei

gleichzeitiger Zunahme großer Plaques ($>700\mu\text{m}^2$). Die Größe der mittleren Plaques zeigt zum selben Zeitpunkt (Alter der Tiere 25 Wochen) keine Veränderungen. APP/PS1-Kontrollen (schwarze Balken) und APP/PS1xABCG2^{-/-} (weiße Balken). Fehlerbalken zeigen SEM. ($n\geq 5$; $*P<0,05$). (D) Die kortikale Plaquesgröße und Färbintensität ist erhöht in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren in einem Alter von 25 Wochen. Von oben nach unten zeigen die Bilder in Reihenfolge APP/PS1-Kontrollen, APP/PS1xABCG2^{-/-}, APP/PS1xABCB1^{-/-} und APP/PS1xABCC1^{-/-}. Anti-A β (6F3D) Färbung. Maßstab 100 μm . (M. Krohn und C. Lange *et al.* ⁽¹²³⁾).

5.2.1 ELISA Messungen in APP/PS1 ABC-Transporter defizienten Mausmodellen

Da die verwendeten bildgebenden Analyseverfahren lediglich ausschnittsweise Ergebnisse liefern können und zudem nur in der Lage sind, aggregierte A β -Spezies nachzuweisen ⁽¹³⁴⁾, werden von allen Tieren zusätzlich quantitative A β 40- und A β 42-Bestimmungen unter Zuhilfenahme des ELISAs vorgenommen. Bestimmt werden jeweils sowohl Gehalte der Puffer-(Carbonat-)löslichen Fraktion, welche hauptsächlich Monomere und niedere Oligomere enthalten, als auch die der Guanidin-löslichen Fraktion bestehend aus stark fibrillärem und aggregiertem Material.

5.2.1.1 Quantitative A β 40 Bestimmungen

Die Ergebnisse der Analyse zeigen, dass in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikante Anstiege des Guanidin-löslichen A β 40 nachweisbar sind, welche im Alter von 25 Wochen dem 14fachen der gemessenen Menge an A β 40 gegenüber den APP/PS1-Kontrollen entsprechen. Wobei auch hier der stärkste Anstieg zwischen 22 und 25 Wochen messbar ist. In APP/PS1xABCG2^{-/-}-Tieren lassen sich keine erhöhten A β 40-Gehalte im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen. Und in APP/PS1xABCB1^{-/-}-Tieren sind erst in fortgeschrittenem Alter der Tiere (25 Wochen) signifikant erhöhte A β 40-Akkumulationen messbar (s. Abb. 10A).

Die Menge an Puffer-löslichem A β 40 steigt in allen untersuchten Stämmen linear an, wobei die Gehalte der APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tiere bereits zu frühen Zeitpunkten signifikant erhöht sind im Vergleich zu den Kontrollen. Während in APP/PS1xABCG2^{-/-}-Tieren keine Unterschiede zu den Kontrollen messbar sind und in APP/PS1xABCB1^{-/-}-Tieren wiederum lediglich zum Zeitpunkt 25 Wochen um 2,5fache erhöhte Werte messbar sind (s. Abb. 10B).

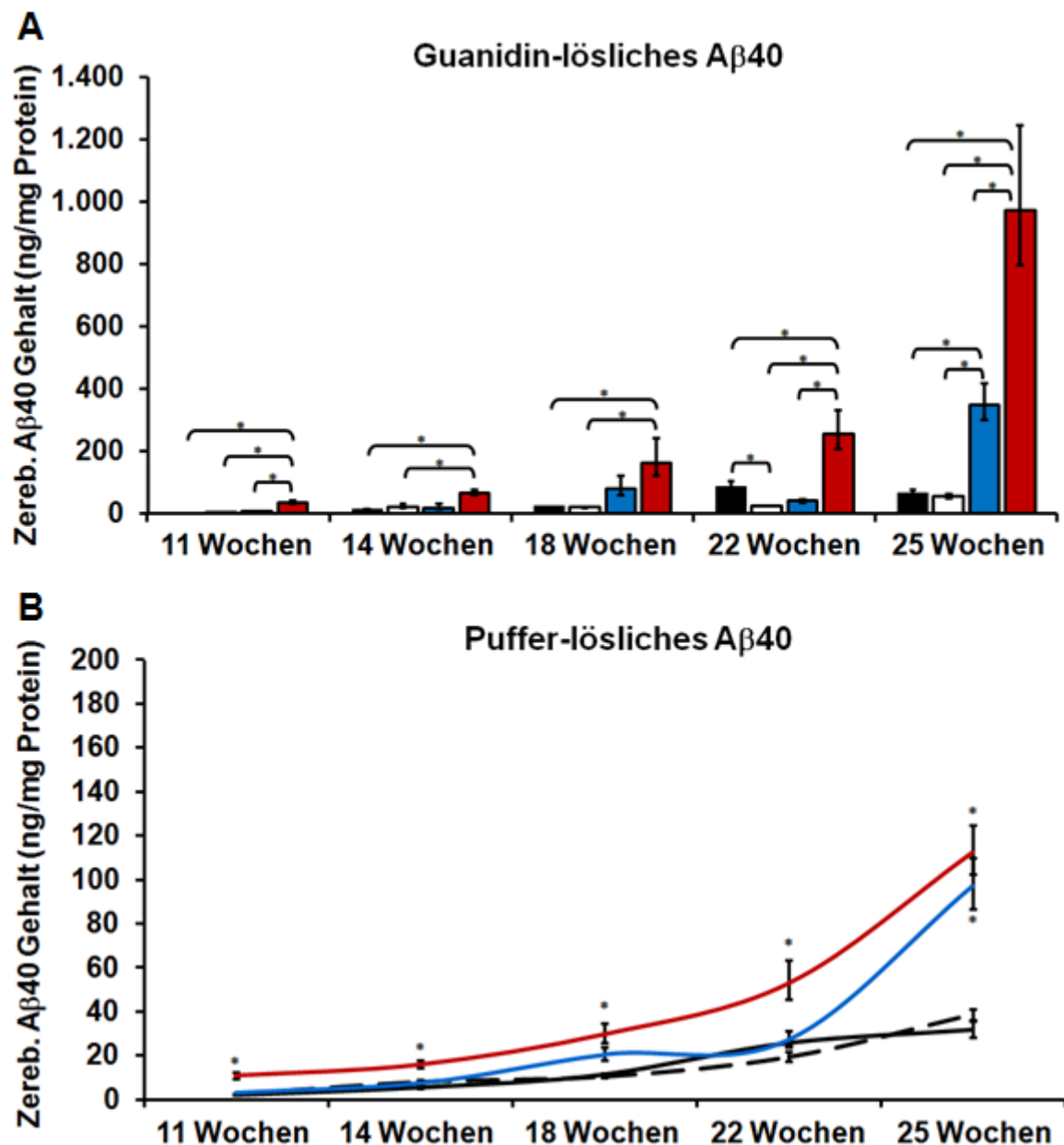


Abbildung 10: Altersabhängige Aβ40-Konzentrationen bestimmt durch ELISA Messungen in APP/PS1 Modellen mit eingekreuzten einfach ABC-Transporter Defiziten. (A) Ein starker Anstieg der Aβ40-Konzentration ist in der Guanidin-löslichen Fraktion messbar. Die Konzentrationen sind bis zu 14fach erhöht in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren (rote Balken) und bis zu 5fach erhöht in APP/PS1xABCB1^{-/-}-Tieren (blaue Balken) im Vergleich zu den Kontrollen (schwarze Balken). Sowohl APP/PS1xABCC1^{-/-} als auch APP/PS1xABCB1^{-/-}-Tiere zeigen bereits zu frühen Zeitpunkten signifikant erhöhte Aβ40-Gehalte. APP/PS1xABCG2^{-/-}-Tiere (weiße Balken) weisen keine erhöhten Aβ40-Gehalte im Vergleich zu den Kontrollen auf. (B) Die Konzentration an Puffer-löslichem Aβ40 steigt zwischen den Zeitpunkten 18 und 25 Wochen in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren (rote Linie) rapide an. Dies kann in der geringeren Aggregationsrate des Aβ40 im Vergleich zu Aβ42 (im Besonderen im Zeitraum von 22 bis 25 Wochen) begründet sein. In APP/PS1xABCB1^{-/-}-Tieren (blaue Linie) ist dieser Anstieg ausschließlich zwischen 22 und 25 Wochen nachweisbar. APP/PS1-Kontrollen – schwarze Linie, APP/PS1xABCG2^{-/-} - gestrichelte Linie. Fehlerbalken zeigen SEM. (n≥4; *P<0,05). (M. Krohn und C. Lange *et al.* ⁽¹²³⁾).

5.2.1.2 Quantitative A β 42 Bestimmungen

Wie bereits in den ermittelten A β 40 Daten und in Übereinstimmung mit den Analysen der Immunhistochemie zeigen sich in APP/PS1xABCG2^{-/-}-Tieren zu keinem Zeitpunkt signifikante Erhöhungen der A β 42-Level im Vergleich zu den jeweils gleichaltrigen Kontrollen, weder in der Guanidin-löslichen Fraktion noch in der Puffer-löslichen Fraktion. In APP/PS1xABCB1^{-/-}-Tieren können erhöhte A β 42-Gehalte gemessen werden, was die Ergebnisse vorangegangener Studien stützt ⁽⁶⁸⁾. Nachweisbar ist, in einem Alter von 25 Wochen, in der Guanidin-löslichen Fraktion eine erhöhte Amyloid Akkumulation um das 3,5fache. Zu allen Zeitpunkten zeigen APP/PS1xABCC1^{-/-}-Mäuse signifikant erhöhte A β 42-Werte. Diese betragen in einem Alter von 25 Wochen zwölfmal mehr Amyloid im Vergleich zu gleichaltrigen APP/PS1-Kontrollen und zu sämtlichen anderen Zeitpunkten mindestens um das 2fache erhöhte Werte in der Guanidin-löslichen Fraktion (s. Abb. 11A). Nachgewiesen werden, konnte zudem, dass sich die A β 42-Gehalte der Puffer-löslichen Fraktion mit zunehmendem Alter erhöhen. Aber im Alter von 25 Wochen, dem Zeitpunkt der höchsten gemessenen A β -Akkumulationsrate der Guanidin-löslichen Fraktion sinken die Werte rapide ab. Verglichen mit den erhaltenen Werten von 22 Wochen um 56% (s. Abb. 11B). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die Ablagerung von β -Amyloid in unlösliche Aggregate. Der Anstieg der Guanidin-löslichen Fraktion zwischen 22 und 25 Wochen verläuft sprunghaft und auch die, in der Immunhistochemie gemessene, kortikale Plauebedeckung erhöht sich in der angegebenen Zeitspanne um 83% (s. Abb. 9A).

Die erhaltenen Daten der analysierten Mausmodelle zu allen untersuchten Zeitpunkten der bildgebenden Analyseverfahren und der quantitativen Bestimmung der A β -Akkumulation ergänzen einander. Diskrepanzen, zwischen gering gemessenen Unterschieden der immunhistologischen Untersuchungen und den extremen Unterschieden der vorgenommenen ELISA Messungen sind erklärbar durch den Charakter der Testmethoden. Während die Immunhistochemie lediglich ausschnittsweise zweidimensionale Ergebnisse liefert, spiegeln die Daten der ELISA Messungen absolut gemessene Werte einer gesamten Hemisphäre wieder und erlauben so eine genaue Quantifizierungen der A β -Akkumulation.

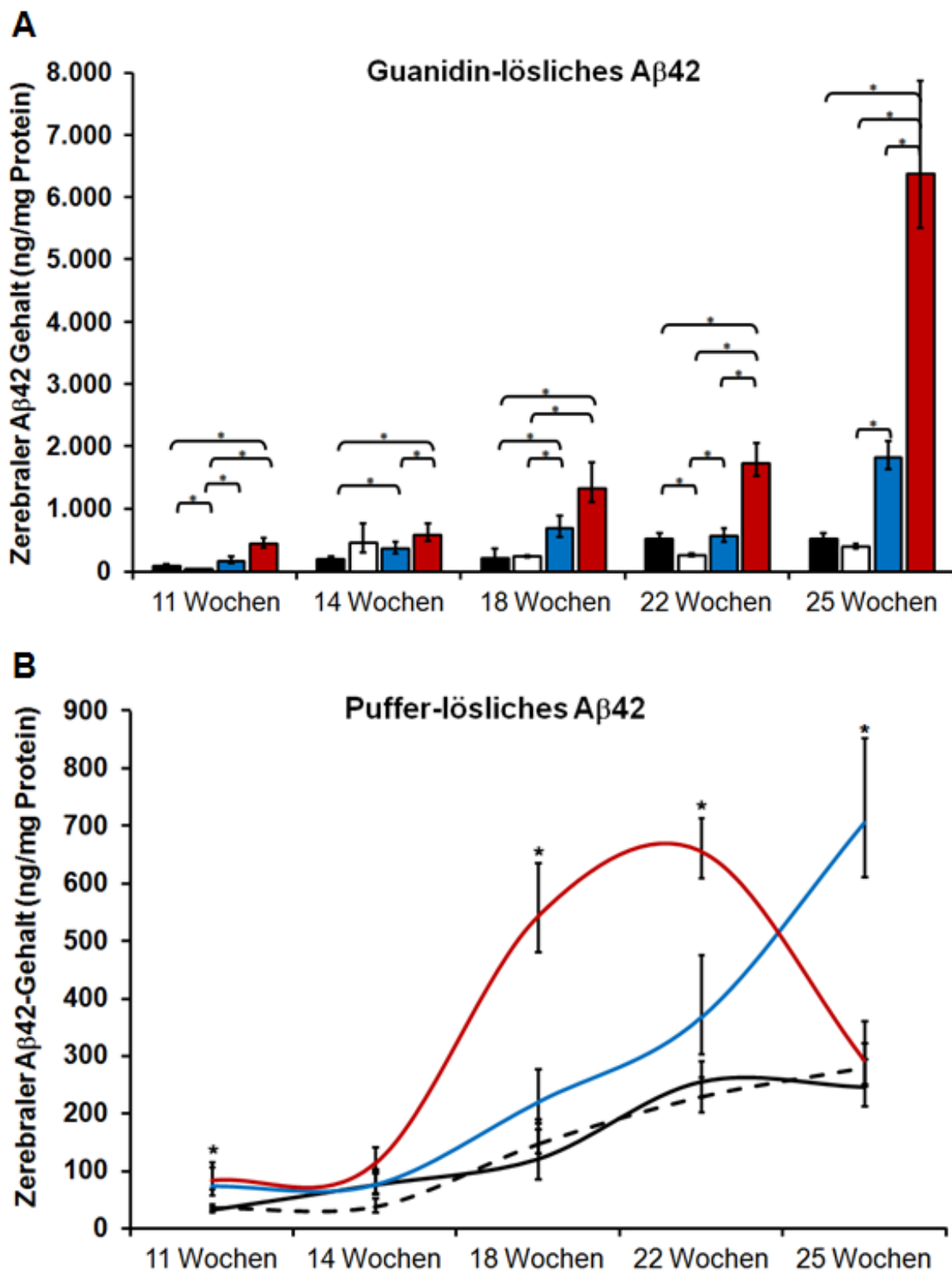


Abbildung 11: Altersabhängige A β 42-Konzentrationen bestimmt durch ELISA Messungen in APP/PS1 Modellen mit einkreuzten einfach ABC-Transporter Defiziten. (A) In APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren (rote Balken) ist ein stark signifikanter, bis zu 12facher A β 42-Anstieg in der Guanidin-löslichen Fraktion messbar. Während die gemessene Erhöhung in APP/PS1xABCB1^{-/-}-Tieren (blaue Balken) maximal das 3,5fache beträgt. Sowohl APP/PS1xABCC1^{-/-}, als auch APP/PS1xABCB1^{-/-}-Tiere zeigen erhöhte A β 42-Ablagerungsraten auch zu frühen Zeitpunkten der Analysereihe im Vergleich zu APP/PS1-Kontrollen (schwarze Balken). APP/PS1xABCC1^{-/-}-Mäuse (weiße Balken) weisen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen auf. Die A β 42-Ablagerungsraten der Guanidin-löslichen Fraktion zeigen deutliche Parallelen zu den A β 40-Ablagerungsraten auf. (B) Die

Konzentration an Puffer-löslichem A β 42 steigt in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren (rote Linie) im Alter zwischen 14 und 18 Wochen rapide an. Ein ähnlicher Anstieg kann auch in APP/PS1xABCB1^{-/-}-Tieren (blaue Linie) verzeichnet werden mit einer zeitlichen Verzögerung von sechs Wochen. Nach 22 Wochen sinkt die Konzentration an Puffer-löslichem A β 42 in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren stark ab, möglicherweise durch eine Ablagerung des Amyloids in unlösliche Aggregate. APP/PS1-Kontrollen – schwarze Linie und APP/PS1xABCG2^{-/-}-Tiere – gestrichelte Linie. Fehlerbalken zeigen SEM. (n \geq 4; *P<0,05). (M. Krohn und C. Lange *et al.* ⁽¹²³⁾).

5.2.2 Einfluss APP-spaltender Enzyme und A β -Proteasen auf die Ablagerungsraten

Dass Änderungen in den A β -Ablagerungsraten der Transporter-defizienten Tiere nicht auf den Einfluss bekannter APP-spaltender Enzyme oder A β -Proteasen zurückzuführen sind, zeigen Western Blot Analysen. Es können hier keine abweichenden Expressionsraten für NEP (Daten nicht dargestellt) und IDE im Vergleich zu Kontrollen ermittelt werden. Auch die Expression der β -Sekretase (BACE1) ist unverändert. Überraschenderweise werden für die α -Sekretase in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren sogar erhöhte Werte in der Protein-Expression ermittelt, was eine zunehmende Bildung toxischer A β -Spezies auf Grund von Expressionsänderungen der Sekretasen ausschließt (s. Abb. 12A).

Die LRP1 (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1) Menge ist in APP/PS1xABCB1^{-/-}- und APP/PS1xABCG2^{-/-}-Tieren signifikant verringert, während APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tiere ähnliche Expressionsraten wie die APP/PS1-Kontrollen aufweisen. Auch Expressionsunterschiede im APP können nicht gefunden werden, welche die Ablagerungsraten in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren erklären würden (s. Abb. 12B).

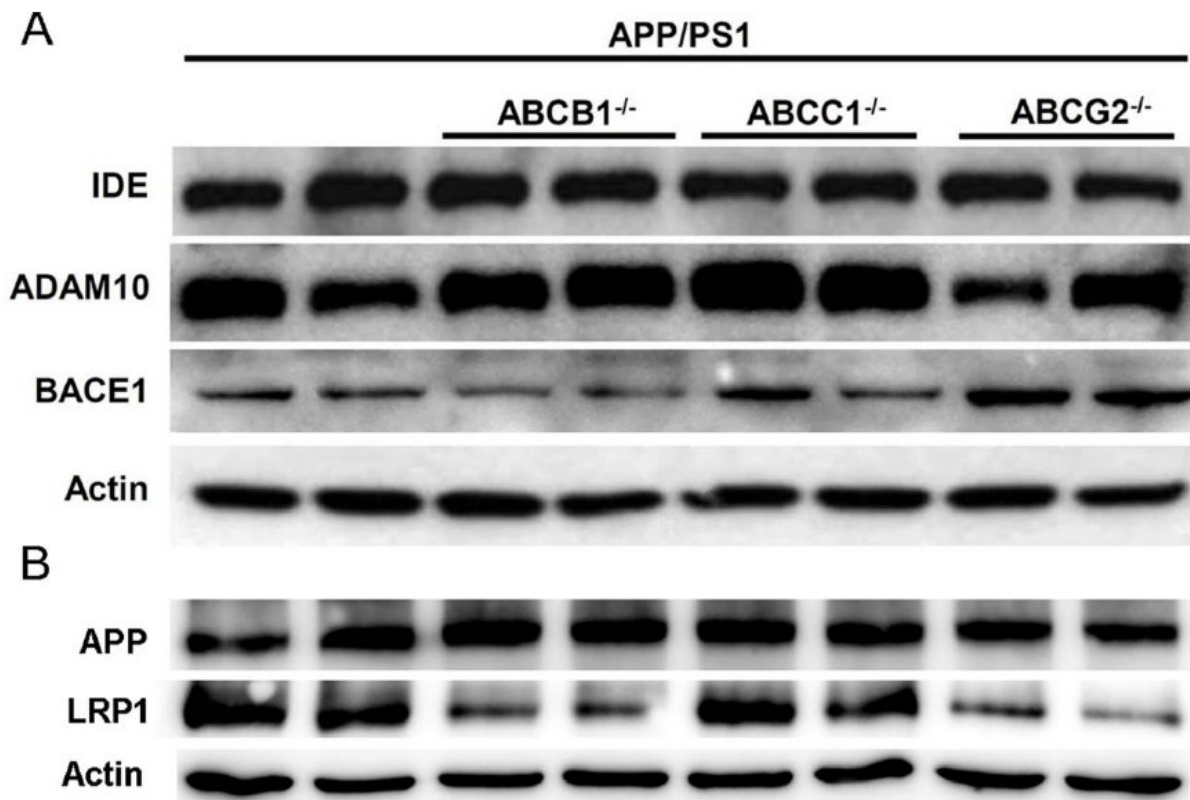


Abbildung 12: Unterschiede in der APP Prozessierung sind nicht verantwortlich für eine beschleunigte A β -Akkumulationen in APP/PS1xABCB1^{-/-} und APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren. (A) Western Blot Analysen zeigen einen kompensatorischen Anstieg von ADAM10 in APP/PS1xABCB1^{-/-}- und APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren, welcher mit dem erhöhten A β -Gehalt einhergeht. Die β -Sekretase (BACE1) Expression ist lediglich in APP/PS1xABCG2^{-/-}-Tieren erhöht. Die IDE (Insulin-degrading enzyme) Expression zeigt keine Veränderungen. **(B)** Die Expression des APP Transgens war in allen untersuchten Stämmen unverändert. Die LRP1 (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1) Menge ist in APP/PS1xABCB1^{-/-}-und APP/PS1xABCG2^{-/-}-Tieren signifikant verringert, während APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tiere ähnliche Expressionsraten wie die APP/PS1-Kontrollen aufweisen. Actin dient als Ladekontrolle für die verwendeten Gesamtproteinmengen. (n=5, 10 μ g je Probe, gepoolt). (M. Krohn und C. Lange *et al.* ⁽¹²³⁾).

5.2.3 Einfluss von Mikroglia auf die Ablagerungenraten

Als ursächlich für erhöhte Ablagerungsraten gilt potentiell auch die Aktivierung der Mikroglia, da sie die Plaquegröße beeinflussen und zu einer frühen A β -Degradation beitragen können ⁽¹²⁶⁾. Immunhistologische Doppelfärbungen von Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) und A β zeigen in allen untersuchten ABC-Transporter-defizienten Stämmen erhöhte Anzahlen Plaque-assoziiierter Mikroglia auf im Alter von 25 Wochen. In APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren kann die intensivste Mikrogliose nachgewiesen werden. Erhöhte A β -Ablagerungsraten in Transporter-defizienten Stämmen sind demnach nicht auf eine verminderte mikrogliale Präsenz zurückzuführen (s. Abb. 13).

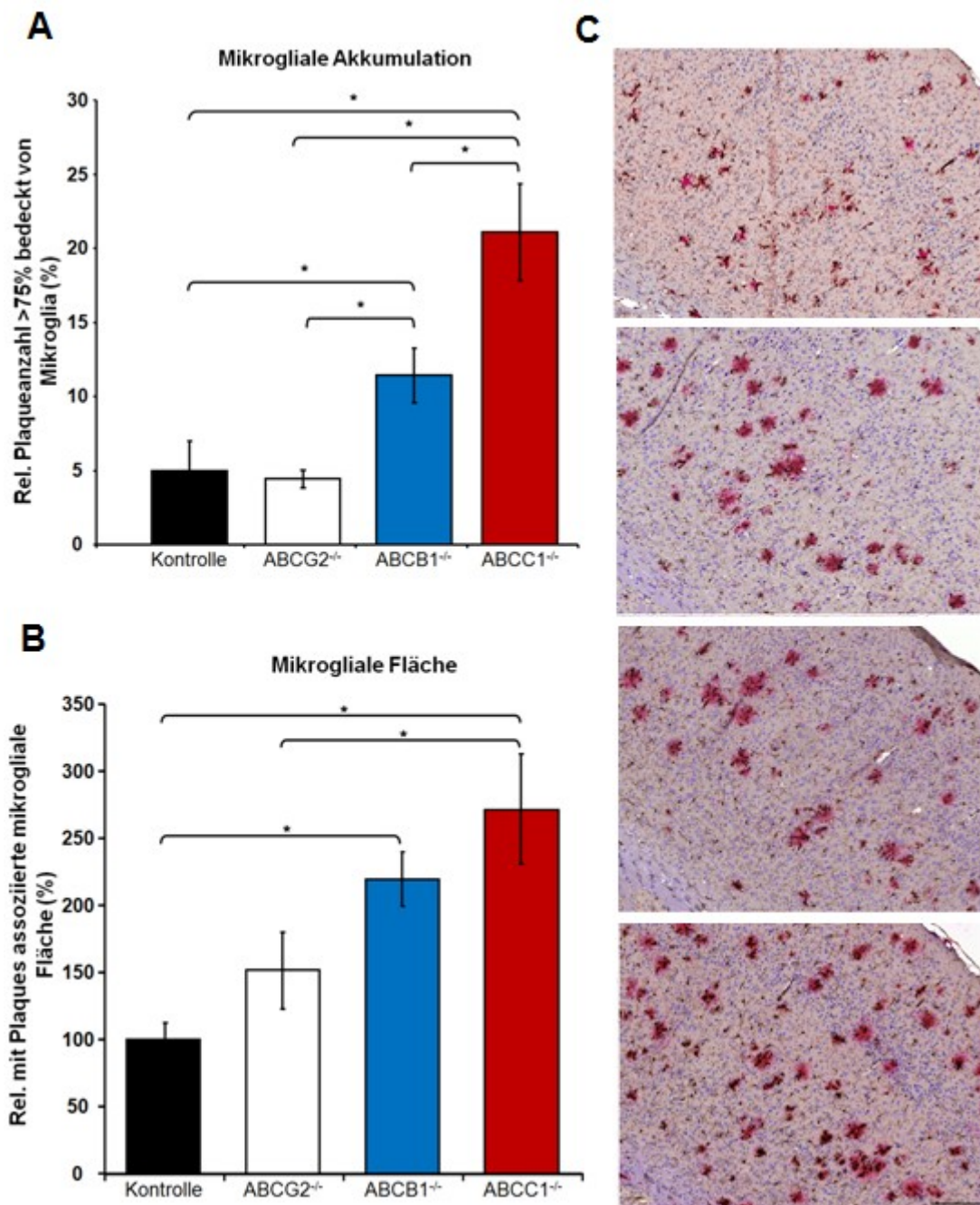


Abbildung 13: Die mikrogliale Dichte steigt mit zunehmender Aβ-Konzentration. (A) Fläche des Neokortex, welche mit Mikroglia-assoziierten Plaques bedeckt ist. (B) Prozentualer Anteil an Aβ-Plaques, welche zu ≥75% von Mikroglia bedeckt sind, ist erhöht, sowohl in APP/PS1xABCB1^{-/-}, als auch in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren, aber nicht in APP/PS1xABCG2^{-/-}-Tieren. Steigende Ablagerungsraten sind nicht auf eine verminderte mikrogliale Antwort zurückzuführen. Fehlerbalken zeigen SEM. (n≥5; *P<0,05). (C) Repräsentative Aufnahmen von Iba1/Aβ Doppelfärbungen in vergleichbaren Regionen des frontalen Neokortex. Mikroglia (Anti Iba1) sind in braun dargestellt und Aβ (Anti Aβ 6F3D) in rot. Von oben nach unten zeigen die Bilder in Reihenfolge APP/PS1-Kontrollen, APP/PS1xABCG2^{-/-}, APP/PS1xABCB1^{-/-} und APP/PS1xABCC1^{-/-}. Maßstab 100µm. (M. Krohn und C. Lange *et al.* ⁽¹²³⁾).

5.2.4 *In vitro* Analysen zur Transportkapazität des ABC-Transporters ABCC1

Gestützt wird die Theorie der direkten Einflussnahme von ABC-Transportern auf die AD-Pathogenese zusätzlich durch den Fakt, dass der Transporter ABCC1 in der Lage ist, *in vitro* den Transport von A β 42 zu erleichtern. Hierzu wird ein Modell primär kultivierter, kapillarer Endothelien genutzt, welche aus Mäusen der Stämme ABCC1^{+/+} und ABCC1^{-/-} gewonnen werden ⁽¹²⁸⁾. Eine Kultivierung auf isolierten Gliazellen dient der Unterstützung der Funktionsweise der Endothelien. Der ECTA (Endothial cell transwell Assay) erfolgt unter Zugabe von A β 42 und Testung der transportierten Menge desselben nach 30, 60 und 120 Minuten, sowie nach weiteren 6 und 24 Stunden. Mittels ELISA gewonnene Ergebnisse liefern ein genaues Bild der A β -Transportraten von der abluminalen (Gehirn) zur luminalen (Blut) Seite (s. Abb. 6). So kann nachgewiesen werden, dass der Transport in ABCC1^{-/-}-Kulturen nach zwei Stunden um 40% und nach weiteren vier Stunden um 60% geringer ist, als in ABCC1^{+/+}-Kulturen (s. Abb. 14).

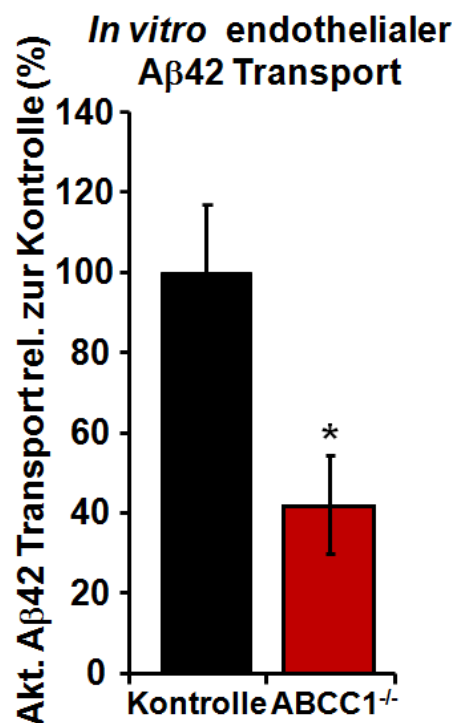


Abbildung 14: Die fehlende Expression von ABCC1 verringert die A β 42-Transportrate *in vitro*. Der *in vitro* Transport von A β 42 von der abluminalen (Gehirn) zur luminalen (Blut) Seite ist in ABCC1^{-/-} Endothelzellen signifikant beeinträchtigt. Die A β 42-Transportrate von ABCC1^{-/-}-Zellen während der ersten sechs Stunden nach A β 42-Zugabe beträgt nur 40% im Vergleich zu ABCC1^{+/+}-Kontrollzellen. Fehlerbalken zeigen SEM. (n \geq 3; *P<0,05). (M. Krohn und C. Lange *et al.* ⁽¹²³⁾).

5.3 APP/PS1 Mausmodelle mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten

Nachdem sowohl die *in vivo* als auch die *in vitro* Daten die Bedeutung von ABCC1 im Mausmodell der einfach-defizienten Tiere zeigen, liegt es nahe, den Einfluss der Defizite mehrerer ABC-Transporter auf die zerebrale A β 42-Ablagerung zu untersuchen, und gegebenenfalls kumulative oder kompensatorische ⁽¹¹⁸⁾ Effekte zu analysieren. Unter Zuhilfenahme von Mausstämmen mit kombinierten zwei- und dreifachen ABC-Transporter-Defiziten werden Langzeitanalysen (11, 14, 18, 22 und 25 Wochen) durchgeführt, welche die Entwicklung von A β 40- und A β 42-Ablagerungen in diesen Tieren im Vergleich zu gleichaltrigen APP/PS1-Kontrollen und gleichaltrigen APPxABCC1^{-/-}-Tieren aufzeigen sollen. Genutzt werden hierzu Tiere der generierten Stämme APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}, APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-}, APP/PS1xABCC1^{-/-}xABCG2^{-/-} und APP/PS1x3ABC^{-/-} eines einheitlichen genomischen Hintergrundes. Erwartet wird, dass die Kombination von mehreren ABC-Transporter-Defiziten ähnliche oder sogar forcierte Effekte auf die Akkumulation von A β 42 aufweisen, wie es für die einfach-defizienten Tiere bereits gezeigt werden konnte.

5.3.1 Immunhistochemische Untersuchungen von APP/PS1 Mausmodellen mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten

Zunächst fällt auf, dass die meisten der untersuchten APP/PS1 Modelle mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten keine signifikanten Erhöhungen in ihren histopathologischen A β -Akkumulationen im Vergleich zu den APP/PS1-Kontrollen aufweisen. Alle Stämme zeigen eine konstante Zunahme ihrer Plaquegröße und der bestimmten kortikalen Plaquebedeckung über die Zeit auf, lediglich die Akkumulationsraten in APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tieren bleiben ab einem Alter von 18 Wochen konstant und stiegen nicht weiter an. Es ist nur eine geringe Zunahme der Plaqueanzahl zwischen 18 und 25 Wochen messbar. Keine Änderungen dagegen ergeben sich über diesen Zeitraum in den Plaquegrößen (s. Abb. 15B). Dies resultiert zum Zeitpunkt von 25 Wochen in einer signifikanten Zunahme der Anzahl der kleinen Plaques (<400 μ m²) um 20%, während die Anzahl der mittleren und vor allem der großen Plaques ein niedriges Niveau beibehält.

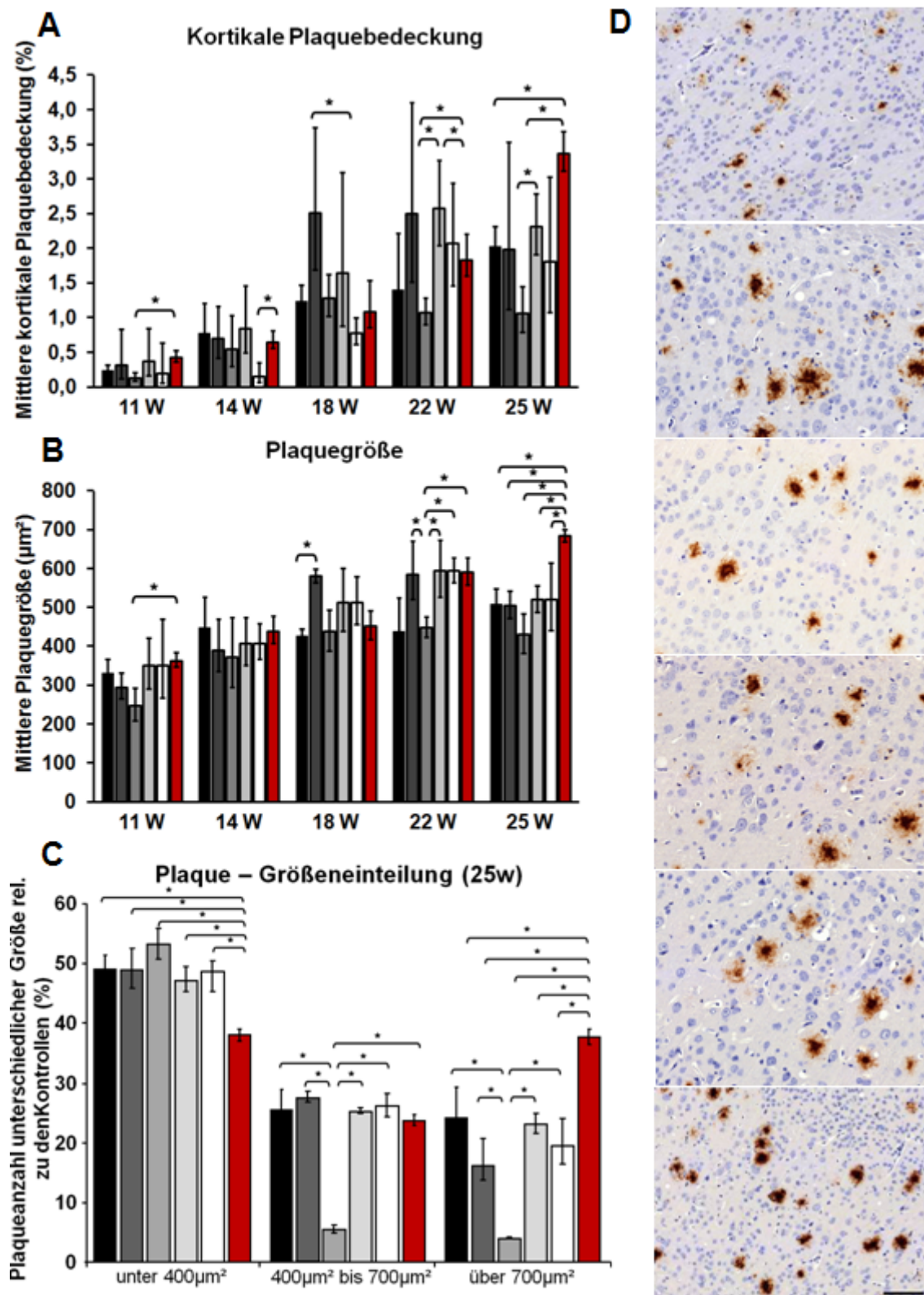


Abbildung 15: Quantifizierung amyloider Ablagerungen unter Verwendung immunhistochemischer Analysen. (A und B) Die körtikalen Plaquebedeckungen und die Plaquegrößen bleiben in den meisten APP/PS1-Stämmen mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten auf annähernd gleichem Niveau zu den APP/PS1-Kontrollen (schwarze Balken). (A) Die Bedeckungsraten in APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tieren (mittelgraue Balken) stagnieren ab einem Alter von 18 Wochen. APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tiere (rote Balken) weisen die höchsten Ablagerungsraten

auf. **(B)** APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tiere zeigen zwischen 18 und 25 Wochen keine Zunahme der Plaquegrößen. Die Größe der Plaques ist in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren signifikant erhöht in einem Alter von 25 Wochen. **(C)** Die Stagnation der Plaquegrößen und die Abnahme der kortikalen Plaquebedeckung in APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tieren gehen einher mit einer signifikanten Abnahme der mittleren (400µm²-700µm²) und großen Plaques (>700µm²) in einem Alter von 25 Wochen. APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tiere zeigen ein gegenteiliges Bild. Im Alter von 25 Wochen weisen sie eine Abnahme der kleinen Plaques (<400µm²) bei gleichzeitiger Zunahme großer Plaques (>700µm²) auf im Vergleich zu den Kontrollen. APP/PS1- Kontrollen – schwarze Balken, APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-} – dunkelgraue Balken, APP/PS1xABCC1^{-/-}xABCG2^{-/-} – hellgraue Balken und APP/PS1x3ABC^{-/-} – weiße Balken. Fehlerbalken zeigen SEM. (n≥3; *P<0,05). **(D)** Repräsentative Aufnahmen von Aβ-Färbungen vergleichbarer Regionen des frontalen Neokortex. Von oben nach unten zeigen die Bilder in Reihenfolge APP/PS1-Kontrollen, APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-}, APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}, APP/PS1xABCC1^{-/-}xABCG2^{-/-}, APP/PS1x3ABC^{-/-} und APP/PS1xABCC1^{-/-}. Anti-Aβ (6F3D) Färbung. Maßstab 100µm.

Zu frühen Zeitpunkten (14 Wochen) zeigen Modelle des Stammes APP/PS1x3ABC^{-/-} noch signifikant geringere Plaquegrößen auf im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen (s. Abb. 15B), dies äußert sich jedoch nicht in einer geringeren kortikalen Plaquebedeckung (s. Abb. 15A), da in diesen Tieren zu diesem Zeitpunkt mehr kleine Plaques (<400µm²) auftreten und weniger große Plaques (über 700µm²) (Daten nicht gezeigt).

5.3.2 ELISA Messungen in APP/PS1 Mausmodellen mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten

Zur quantitativen Erfassung der unterschiedlichen Aβ-Spezies dienen sowohl Aβ40 als auch Aβ42 Messungen der löslichen (Puffer-lösliche Fraktion) und unlöslichen (Guanidin-löslichen Fraktion) Fraktionen. Für eine Untersuchung der Langzeitkinetik werden Analysen zwischen einem Alter von 11 bis 25 Wochen der Tiere durchgeführt und erfolgen mittels ELISA Messungen.

5.3.2.1 Quantitative Aβ40 Bestimmungen

Die Messungen zeigen einen konstanten linearen Anstieg des Puffer-löslichen Aβ40 über den gesamten untersuchten Zeitraum in allen Stämmen. Unterbrochen nur von einem rapiden Anstieg der Aβ40-Konzentration der APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tiere im Alter von 18 Wochen um das 5fache im Vergleich zu gleichaltrigen APP/PS1-Kontrollen (s. Abb. 16A). Die Kinetik der APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tiere zu Grunde legend, sollte der Anstieg und anschließende Abfall des Puffer-löslichen Aβ40 einhergehen mit einer verzögerten Zunahme des Guanidin-löslichen Aβ40. Dies ist aber nicht der Fall. Die Konzentration des Guanidin-löslichen Aβ40 in APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tieren zeigt ab einem Alter von 18 Wochen einen stetigen Zuwachs dieser Aβ-Spezies, der im Vergleich zu den APP/PS1-Kontrollen

signifikant höher ist, aber keinen rapiden Anstieg zu verzeichnen hat. Alle anderen untersuchten Stämme zeigen in der Langzeitkinetik eine lineare Zunahme der A β 40 Akkumulation in der Guanidin-löslichen Fraktion, jedoch keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu den Kontrollen (s. Abb. 16B).

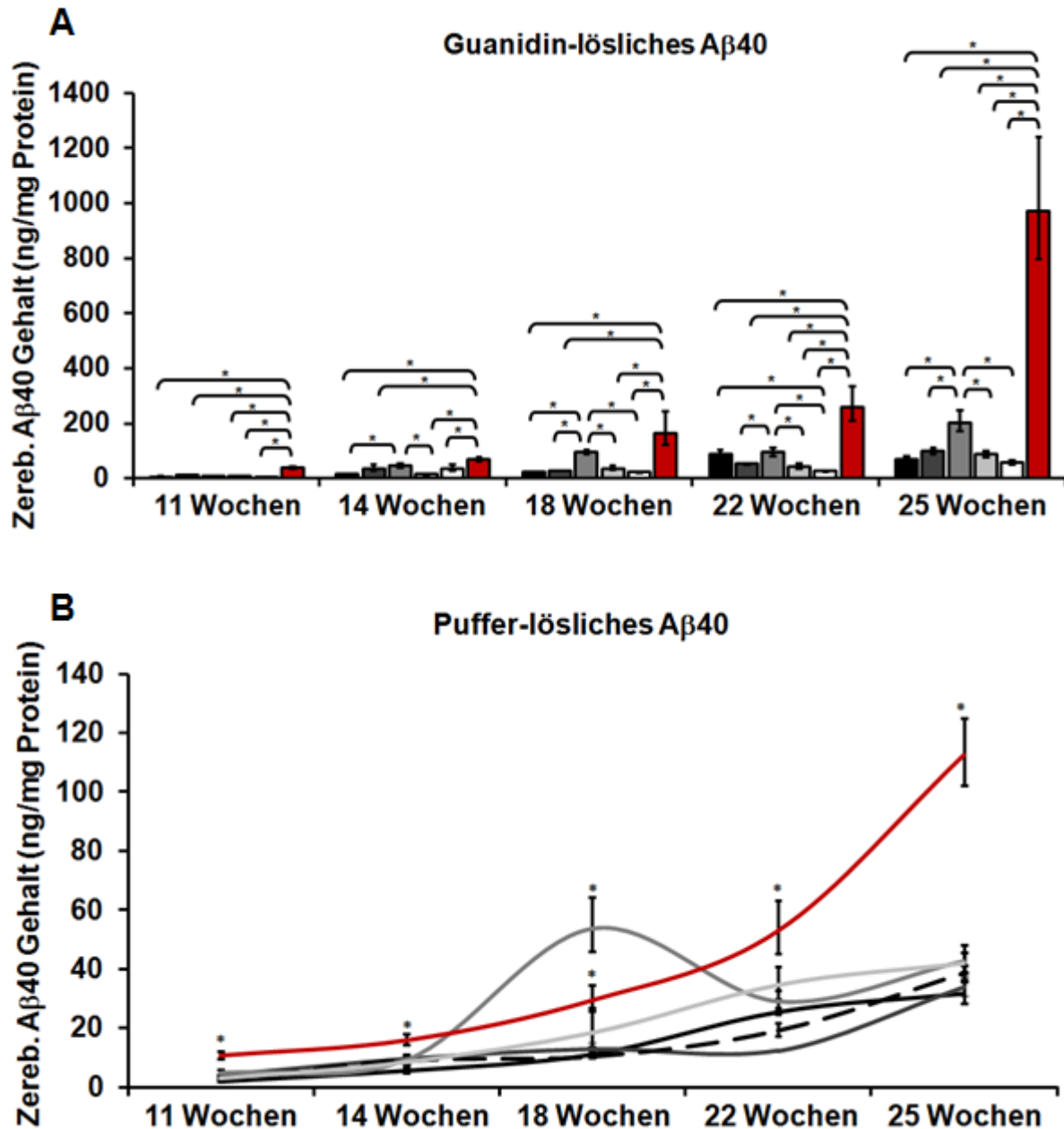


Abbildung 16: Altersabhängige A β 40-Konzentrationen bestimmt durch ELISA Messungen in APP/PS1 Modellen mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten im Vergleich zu APP/PS1xABCC1^{-/-} und Kontrollen. (A) Ein signifikanter Anstieg der A β 40-Konzentration ist in der Guanidin-löslichen Fraktion messbar in APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-} (mittelgraue Balken), und APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren (rote Balken). Die Konzentrationen sind bis zu 2,5fach (in APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}) und 14fach (APP/PS1xABCC1^{-/-}) erhöht im Vergleich zu den APP/PS1-Kontrollen (schwarze Balken). Alle anderen untersuchten Stämme weisen keine erhöhten A β 40-

Gehalte im Vergleich zu den Kontrollen auf. APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-} - dunkelgraue Balken, APP/PS1xABCC1^{-/-}xABCG2^{-/-} - hellgraue Balken und APP/PS1x3ABC^{-/-} - weiße Balken. **(B)** Die Konzentration an Puffer-löslichem A β 40 steigt in APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tieren (mittelgraue Linie) im Alter von 18 Wochen rapide an und zwischen den Zeitpunkten 18 und 25 Wochen in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren (rote Linie). Alle anderen untersuchten Stämme weisen keine Unterschiede in ihren Puffer-löslichen A β 40-Gehalten im Vergleich zu den APP/PS1-Kontrollen (schwarze Linie) auf. APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-} - dunkelgraue, APP/PS1xABCC1^{-/-}xABCG2^{-/-} - hellgraue Linie und APP/PS1x3ABC^{-/-} - gestrichelte Linie. Fehlerbalken zeigen SEM. (n \geq 4; *P<0,05).

5.3.2.2 Quantitative A β 42 Bestimmungen

Die A β 42 Messungen der Guanidin-löslichen Fraktion zeigen, dass lediglich APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Modelle erhöhte Mengen an zerebralem A β 42 aufweisen. Sie zeigen über eine Zeitspanne von 14 bis 25 Wochen signifikant erhöhte A β -Gehalte im Vergleich zu den jeweiligen, gleichaltrigen Kontrollen auf. Diese entsprechen im Alter von 25 Wochen der 3,5fachen Menge gegenüber den gemessenen Kontrollen. Alle anderen untersuchten Mausstämmen, welche eine Kombination mit einem ABCC1-Defizit aufweisen, zeigen keine signifikanten Erhöhungen in der A β -Akkumulation gegenüber der APP/PS1-Kontrolltiere. Für keinen der untersuchten Stämme können vergleichbare Akkumulationsraten ermittelt werden, den APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren entsprechend. In allen Modellen zeigt die Langzeitkinetik aber eine stetige Erhöhung über die Zeit (s. Abb. 17A). Auch in der Puffer-löslichen Fraktion erfolgt eine lineare Zunahme der A β 42-Gehalte über die gesamte gemessene Zeitspanne. Genau wie in den A β 40 Messungen der Puffer-löslichen Fraktion gibt es einen rapiden, signifikanten Anstieg in den APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tieren in einem Alter von 18 Wochen, gefolgt von einem erneuten Abfall auf das A β 40 Niveau der anderen gemessenen Stämme zum selben Zeitpunkt und einem weiteren linearen Anstieg (s. Abb. 17B).

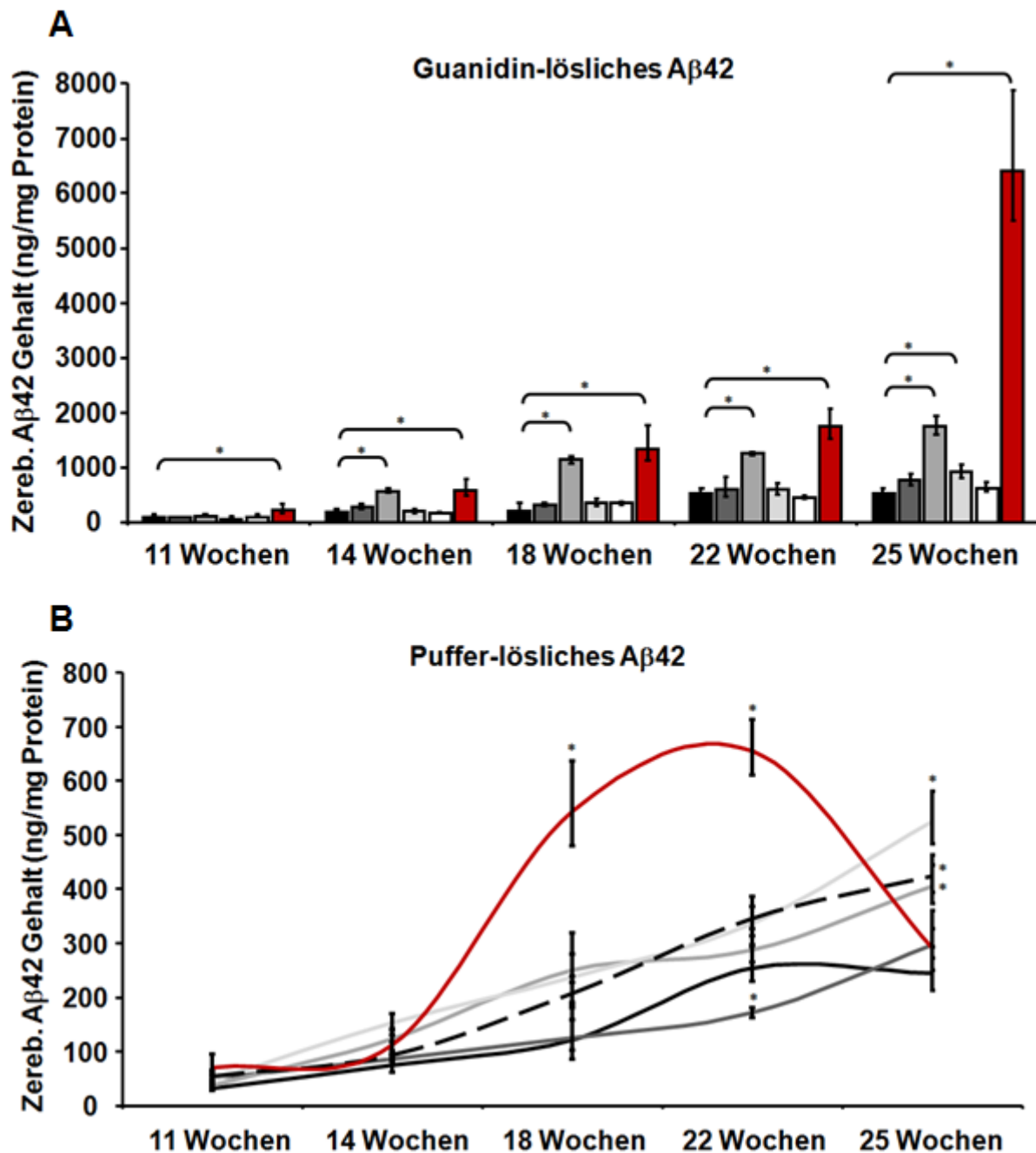


Abbildung 17: Altersabhängige Aβ42-Konzentrationen bestimmt durch ELISA Messungen in APP/PS1-Modellen mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten im Vergleich zu APP/PS1xABCC1^{-/-} und Kontrollen. (A) In APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren (rote Balken) ist ein starker Aβ42-Anstieg in der Guanidin-löslichen Fraktion messbar. Annähernd gleiche oder gar höhere Werte sind in mehrfach-defizienten Stämmen, welche ein ABCC1-Defizit beinhalten, nicht messbar. Lediglich APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tiere (mittelgraue Balken) zeigen erhöhte Ablagerungsraten in einer Zeitspanne zwischen 14 und 25 Wochen. Diese Erhöhung reicht bis zur 3,5fachen Menge der gemessenen Aβ-Akkumulation in vergleichbaren APP/PS1-Kontrollen (schwarze Balken). APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-} - dunkelgraue Balken, APP/PS1xABCC1^{-/-}xABCG2^{-/-} - hellgraue Balken und APP/PS1x3ABC^{-/-} - weiße Balken. **(B)** Alle untersuchten APP/PS1 Stämme mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten zeigen eine konstante Zunahme an Puffer-löslichem Aβ42 über die Zeit. APP/PS1- Kontrollen – schwarze Linie, APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-} - dunkelgraue, APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-} - mittelgraue Linie, APP/PS1xABCC1^{-/-}xABCG2^{-/-} - hellgraue Linie, APP/PS1x3ABC^{-/-} - gestrichelte Linie und APP/PS1xABCC1^{-/-} - rote Linie. Fehlerbalken zeigen SEM. (n≥3; *P<0,05).

5.3.1 *In vitro* Analysen zur A β 42 Transportkapazität in Stämmen mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten

Unter Zuhilfenahme des *in vitro* Zellkulturmodells ECTA werden die generierten Mausstämme mit kombinierten ABC-Transporter-Defiziten auf ihre A β 42-Transportraten untersucht. Diese Daten stützen die Erhebungen der *in vivo* Analysen. Während in ABCC1^{-/-}-Kulturen zu unterschiedlich gemessenen Zeitpunkten die Transportraten durchschnittlich um 40% nach zwei Stunden und sogar um 60% nach sechs Stunden reduziert sind, zeigen Kulturen kombinierter ABC-Transporter-Defizite keine negative Beeinflussung ihres A β 42-Transportverhaltens durch die fehlende Expression mehrerer Transporter. So zeigt sich gegenteilig sogar, dass 3ABC^{-/-}-Kulturen nach zwei Stunden um das zweifache erhöhte A β -Transportraten aufweisen (s. Abb. 18).

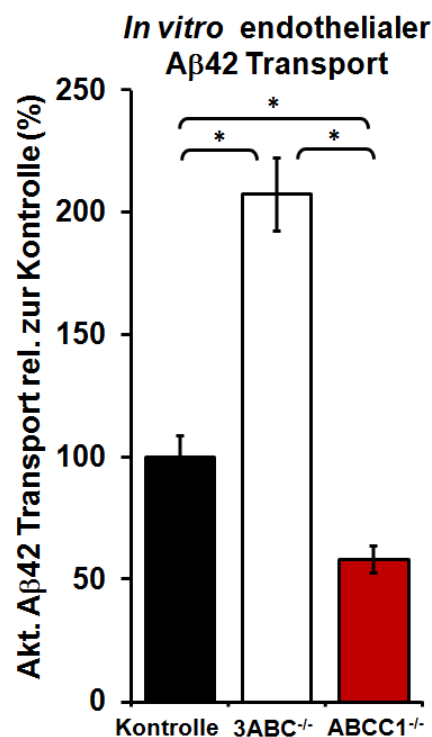


Abbildung 18: Die fehlende Expression anderer ABC-Transporter im Zusammenhang mit ABCC1 führt nicht zu reduzierten A β 42-Transportraten *in vitro*. Der *in vitro* Transport von A β 42 von der abluminalen (Gehirn) zur luminalen (Blut) Seite zeigt in Endothelzellkulturen kombinierter Transporter-Defizite keine signifikant verschlechterten Transportraten im Vergleich zu WT-Kulturen. 3ABC^{-/-}-Kulturen weisen um das zweifache verbesserte Transportraten nach zwei Stunden auf. In ABCC1^{-/-}-Endothelzellen ist der *in vitro* Transport von A β 42 signifikant beeinträchtigt. Die A β 42-Transportrate von ABCC1^{-/-}-Zellen während der ersten zwei Stunden nach A β 42-Zugabe beträgt nur 40% im Vergleich zu Wildtyp (WT) Kontrollzellen. Fehlerbalken zeigen SEM. (n \geq 3; *P<0,05).

5.3.2 Microarray Analysen zur Identifizierung kompensatorischer Mechanismen

Die *in vivo* gewonnenen Daten legen den Schluss nahe, dass es sekundäre Effekte im Gehirn der untersuchten Tiere geben muss, die den Ausfall mehrerer Transporter, insbesondere in Kombination mit ABCC1, kompensieren und lösliche A β -Spezies aus dem Gehirn der untersuchten Tiere exportieren. Auch die *in vitro* gesammelten Ergebnisse, gerade die, der Transportraten in 3ABC^{-/-}-Kulturen, stützen diese Behauptung. Es liegt nahe zu vermuten, dass diese kompensatorischen Effekte einem bisher unbekannten Transporter zuzuschreiben sind, da der Einfluss von Transportmolekülen auf die A β -Akkumulation in der Alzheimer Demenz Pathogenese nachweisbar ist, und transportunabhängige Prozesse *in vitro* auszuschließen sind.

Erste durchgeführte Genexpressionsanalysen mittels Microarray unterstreichen die Hypothese. Hierzu werden APP/PS1-, APP/PS1xABCC1^{-/-}- und APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-}-Tiere in einem ersten Versuch in einem Alter von 100 Tagen (14 Wochen) untersucht. In den Ergebnissen kristallisiert sich in APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den APP/PS1-Kontrollen und den APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren ein auffälliges Gen heraus. Das *Sclo1a4* Gen, welches das Protein des Organo-Anionen Transporter 1a4 (OATP – Organo-Anionen-Transporter Protein 1a4) kodiert, weist eine um das 30fache erhöhte Expression in APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-}- Tieren auf. In APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren kann eine erhöhte Expression dieses Transportmoleküls nicht nachgewiesen werden. Und im Gegensatz zu den APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-}-Tieren zeigen APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tiere in einem Alter von 14 Wochen bereits signifikant erhöhte Ablagerungsraten, sowohl histopathologisch, als auch in der quantitativen A β 40/A β 42-Bestimmungen mittels ELISA.

5.4 Therapieansätze

5.4.1 Der Einfluss des Thiethylperazins auf die Aktivität von ABCC1

Vor der Testung des Thiethylperazins im Mausmodell erfolgt eine Überprüfung der Messungen von Wesolowska *et al.* ⁽¹¹⁰⁾. Diese bestätigt vormals erhobene Datensätze und zeigt, dass Thiethylperazin in der Lage ist, die Aktivität von ABCC1 zu steigern.

Ein *in vitro* durchgeführtes ABCC1-Aktivitätsassay zeigt, dass Thiethylperazin in der Lage ist die Transport-Aktivität von ABCC1 um 69% zu erhöhen. Hierzu werden Membran-Präparationen von Sf9-Zellen genutzt und mittels des SB MRP1 PREDEASY ATPase Kits (Solvo Biotechnology, USA) gemessen. Als Substrat der Messung dient NEM-GS. Vanadat wird als Kontrolle für unspezifische ATPase Aktivität eingesetzt. Die Messungen zeigen, dass Thiethylperazin ein Aktivator aber kein Substrat für ABCC1 darstellt (s. Abb. 19) und bestätigen die Daten von Wesolowska *et al.* ⁽¹¹⁰⁾.

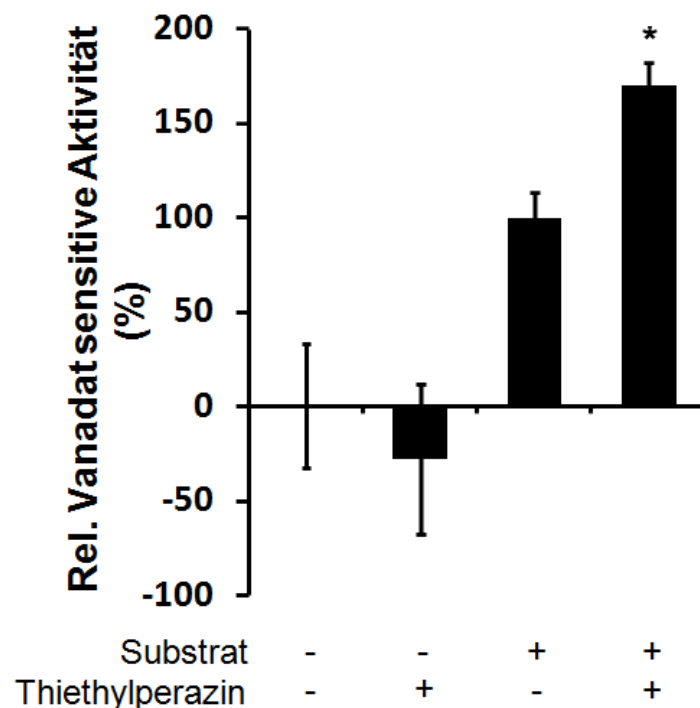


Abbildung 19: Thiethylperazin verstärkt die ABCC1 Transport-Aktivität. Ein ABCC1-Aktivitätsassay, welches NEM-GS als Substrat verwendet, unterstützt die von Wesolowska *et al.* gewonnenen Daten ⁽¹⁰⁷⁾. Die Messungen zeigen, dass Thiethylperazin ein Aktivator aber kein Substrat für ABCC1 ist, denn es ist keine Aktivität messbar ohne Zugabe von NEM-GS. Fehlerbalken zeigen SEM. (n=3, *P<0.05). (M. Krohn und C. Lange *et al.* ⁽¹²³⁾).

5.4.2 Behandlung von APP/PS1-Tieren im genetischen FVB/N Hintergrund

Zur Testung der Wirksamkeit von Thiethylperazin bei der Alzheimer Demenz werden Tiere des Modells APP/PS1 einmal täglich mittels oraler Applikation in einer Dosierung von 15mg/kg Körpergewicht (KG) (humane Dosis) mit dem Medikament behandelt. Eine präventive Behandlung von APP/PS1-Tieren erfolgt ab einem Alter von 45 Tagen über einen Zeitraum von 55 Tagen, da dieser Zeitpunkt den Beginn erster A β -Akkumulationen im Gehirn dieses Mausmodells markiert ⁽¹¹⁹⁾. Da die Alzheimer Demenz nicht vorhersehbar ist und gesicherte Diagnosen erst nach Beginn erster Symptome gestellt werden können, ist als zweite Behandlungsform eine therapeutische Gabe des Thiethylperazins angedacht, welche ab einem Alter von 75 Tagen beginnt. Tiere dieses Alters zeigen bereits erste Demenzsymptome und entsprechen damit AD-Patienten im Frühstadium. Die Mäuse werden wiederum einmal täglich mit einer Dosis von 15mg/kg KG behandelt, über einen Zeitraum von 25 Tagen.

Analysen, wie die Erfassung von Verhaltensdaten und die quantitative A β 40- und A β 42-Bestimmung (ELISA), erfolgen in einem Alter von 100 Tagen (entsprechend 14 Wochen).

APP/PS1xABCC1-Tiere dienen als Negativ-Kontrolle und erfahren die gleichen Behandlungszeiträume und Behandlungsarten wie APP/PS1-Mäuse. Behandlungen innerhalb dieses Modells dürften sich nicht positiv auf die A β -Akkumulationsraten und das Verhalten der Tiere auswirken, wenn die Wirkung des Thiethylperazins auf die Aktivierung des ABCC1-Transporters beschränkt ist.

Als weitere Kontrollen dienen in allen untersuchten Mausstämmen unbehandelte Tiere, welche die Auswirkungen des Thiethylperazins auf behandelte Tiere vergleichend deutlich machen sollen. Es werden an dieser Stelle unbehandelte Tiere verwendet, da keine Unterschiede in den amyloiden Ablagerungsraten unbehandelter und mit Wasser behandelter Tiere messbar sind (Daten nicht gezeigt). Es liegen Theorien vor, dass bereits das tägliche Handling und die regelmäßige Beschäftigung mit den Tieren einen positiven Einfluss auf das Verhalten und den Verlauf der induzierten Alzheimer Demenz haben können. Dies ist in den verwendeten Modellen nicht der Fall. Aus diesem Grund und um die Anzahl der für die Versuche verwendeten Tiere so gering wie möglich zu halten, wird auf eine Thiethylperazin-Behandlung der Kontrolltiere verzichtet.

5.4.2.1 Auswirkungen der Thiethylperazin Behandlung auf die A β 40 Akkumulation

Therapeutisch, mit 15mg/kg KG behandelte APP/PS1-Tiere werden nach 25tägiger Gabe des Thiethylperazins zunächst auf ihre A β 40-Akkumulationsraten untersucht. Es zeigt sich, dass keine Reduktionen in der Guanidin-löslichen Fraktion behandelter Tiere gegenüber den Kontrollen zu erwirken sind und dies möglicherweise in der Kürze des Behandlungszeitraumes begründet liegt (s. Abb. 20A).

Gleichzeitig kann aber auch nachgewiesen werden, dass die Puffer-löslichen A β 40-Spezies nach Ablauf der Behandlung bereits signifikant um 60% im Vergleich zu den Kontrollen reduziert werden können (s. Abb. 20B).

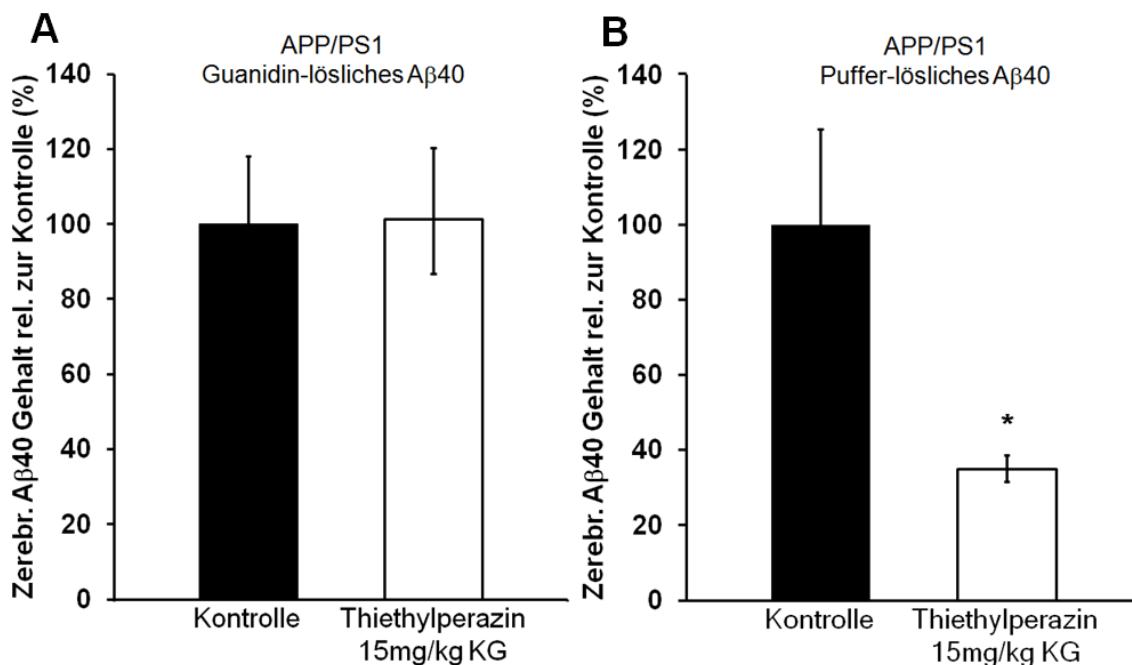


Abbildung 20: Eine therapeutische Behandlung mit Thiethylperazin hat einen reduzierenden Effekt auf die zerebrale A β 40-Konzentration in APP/PS1-Tieren. (A und B) Die untersuchten Mäuse werden täglich mit 15mg/kg KG Thiethylperazin behandelt über einen Zeitraum von 25 Tagen ab einem Alter von 75 Tagen. (B) Der A β 40-Gehalt ist ausschließlich in der Puffer-löslichen Fraktion signifikant reduziert. Fehlerbalken zeigen SEM. (n \geq 4; *P<0,05). (M. Krohn und C. Lange *et al.* ⁽¹²³⁾).

5.4.2.2 Auswirkungen der Thiethylperazin Behandlung auf die A β 42 Akkumulation

Die Ergebnisse einer präventiven Behandlung über 55 Tage ab einem Alter von 45 Tagen zeigen, dass die A β -Gehalte der Puffer-löslichen Fraktion um 60% in APP/PS1-Mäusen reduziert sind. Gleichzeitig weisen behandelte APP/PS1xABCC1^{-/-}-Negativ-Kontrollen keine signifikanten Unterschiede bei gleicher Behandlung auf (s. Abb. 21A-B) im Vergleich zu ihren

unbehandelten, gleichaltrigen Kontrollen, was initial auf eine Reduktion des A β -Levels in behandelten APP/PS1-Mäusen über die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin schließen lässt.

Eine therapeutische Behandlung über 25 Tage mit einer täglichen Gabe von 15mg/kg KG Thiethylperazin ab einem Alter von 75 Tagen führt nicht zu einer Reduktion des Guanidin-löslichen A β 42 (s. Abb. 21C), aber zu einer 60%igen Reduktion des A β 42-Gehaltes in der Puffer-löslichen Fraktion gegenüber den Kontrollen (s. Abb. 21D). Diese Daten decken sich mit der relativen Reduktion, welche für die A β 40-Spezies bei gleicher Behandlung erreicht wird (s. Abb. 20B).

Auch die gewonnenen Daten der Plaques zeigen im Gehirn therapeutisch behandelter Tiere bereits deutliche Unterschiede. So weisen die behandelten Tiere 50% weniger Plaques in den gemessenen kortikalen Bereichen des Gehirns auf und zusätzlich um 40% verringerte Plaquegrößen (s. Abb. 21E-F).

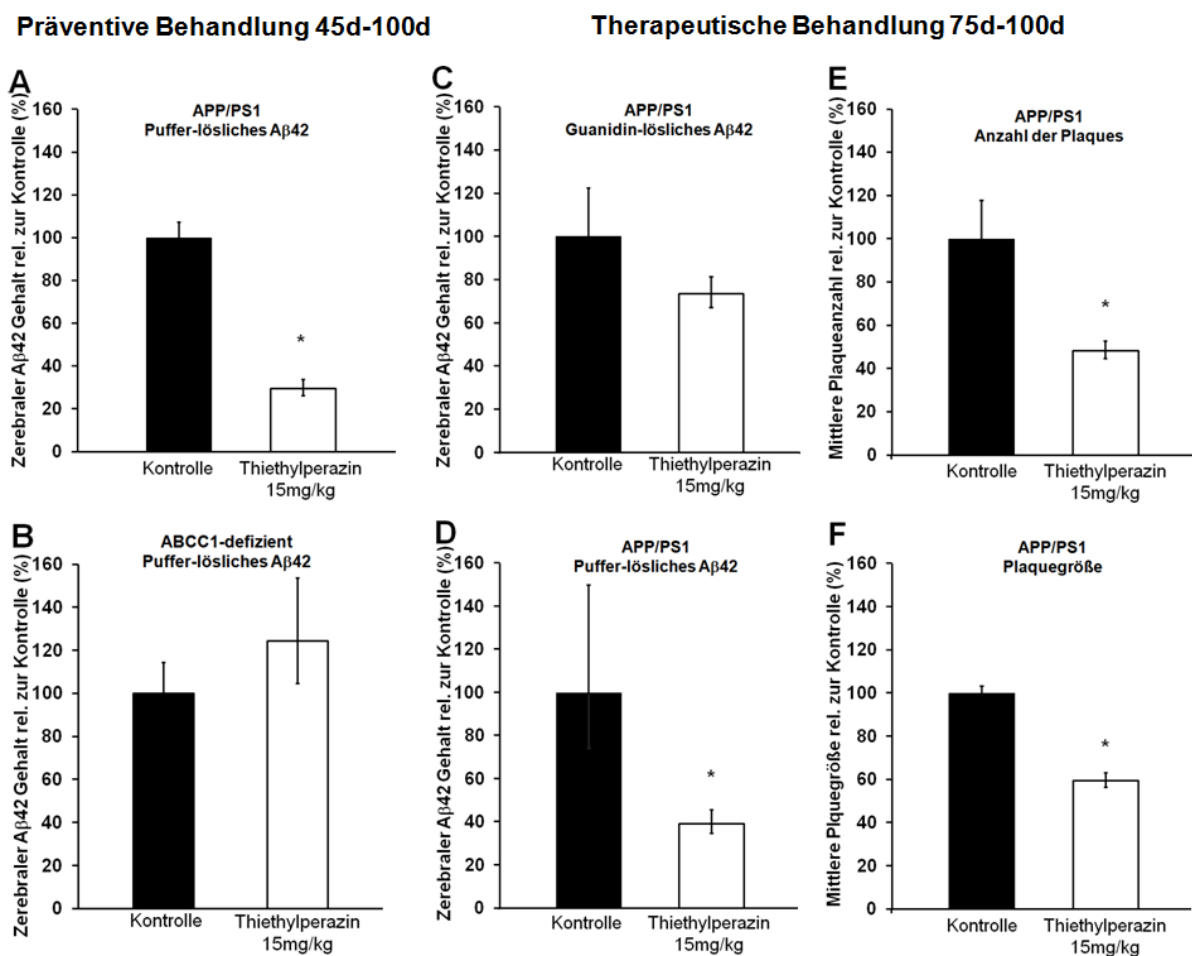


Abbildung 21: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin reduziert die A β -Akkumulation. (A und B) Den Mäusen wird über einen Zeitraum von 55 Tagen ab einem Alter von 45 Tagen täglich eine Dosis von 15mg/kg KG Thiethylperazin oral appliziert. **(A)** Die Aktivierung von ABCC1 reduziert den A β -Gehalt in der Puffer-löslichen Fraktion von untersuchten APP/PS1-Mäusen

um 70%. **(B)** Es ist keine signifikante Reduktion des A β -Gehaltes in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren nachweisbar, Die Reduktion des A β -Gehaltes in APP/PS1-Tieren wird durch eine Induktion von ABCC1 verursacht. **(C bis F)** Die Mäuse wurden täglich mit 15 mg/kg KG Thiethylperazin ab einem Alter von 75 Tagen über einen Zeitraum von 25 Tagen behandelt. **(D)** Sowohl die Puffer-lösliche Fraktion, **(E und F)** als auch die Anzahl und Größe der Plaques ist signifikant reduziert. Fehlerbalken zeigen SEM. (n \geq 3; *P<0,05). (M. Krohn und C. Lange *et al.* ⁽¹²³⁾).

5.4.2.3 Auswirkungen der Thiethylperazin Behandlung auf das Verhalten der Tiere

Um den Erfolg der Behandlung mit Thiethylperazin nachzuweisen, sind Verhaltenstests unabdingbar. Verhaltensanalysen dienen als Indikator für die Kognition. Eine verbesserte Kognition weist wiederum auf den Erfolg einer Behandlung hin und spielt im besonderen Maße eine Rolle in der Behandlung von AD-Patienten. Eine Möglichkeit der Untersuchung der kognitiven Fähigkeiten von Versuchstieren ist das Y-Maze. Ein aussagekräftiger Parameter zur Beurteilung einer beeinflussten Kognition in behandelten APP/PS1-Mausmodellen ist die wiederholte Begehung desselben Arms. Dieser Parameter trifft eine Aussage darüber, ob Tiere in der Lage sind, sich an den eben begangenen Arm zu erinnern und dient damit der Beurteilung der Funktion des Kurzzeitgedächtnisses. Gleichzeitig kann die Einflussnahme von Begleiterscheinungen, wie Depressionen, die vermehrt bei fortschreitenden, neurodegenerativen Erkrankungen auftreten, untersucht werden. Denn diese können das Verhalten der Tiere ebenso negativ beeinflussen, wie die Haupterkrankung.

Es zeigt sich hier, dass eine kurzzeitige, therapeutische Gabe von Thiethylperazin über einen Zeitraum von 25 Tagen noch nicht zu signifikanten Veränderungen im Verhalten behandelter Mäuse und ihren gleichaltrigen Kontrollen führt (s. Abb. 22C). Es werden zwar bereits signifikante Unterschiede in den Ablagerungsraten in den Gehirnen der Tiere gemessen (s. Abb. 20 und 21), der Behandlungszeitraum reicht scheinbar jedoch noch nicht aus, um einen signifikanten Einfluss auf die Kognition zu nehmen.

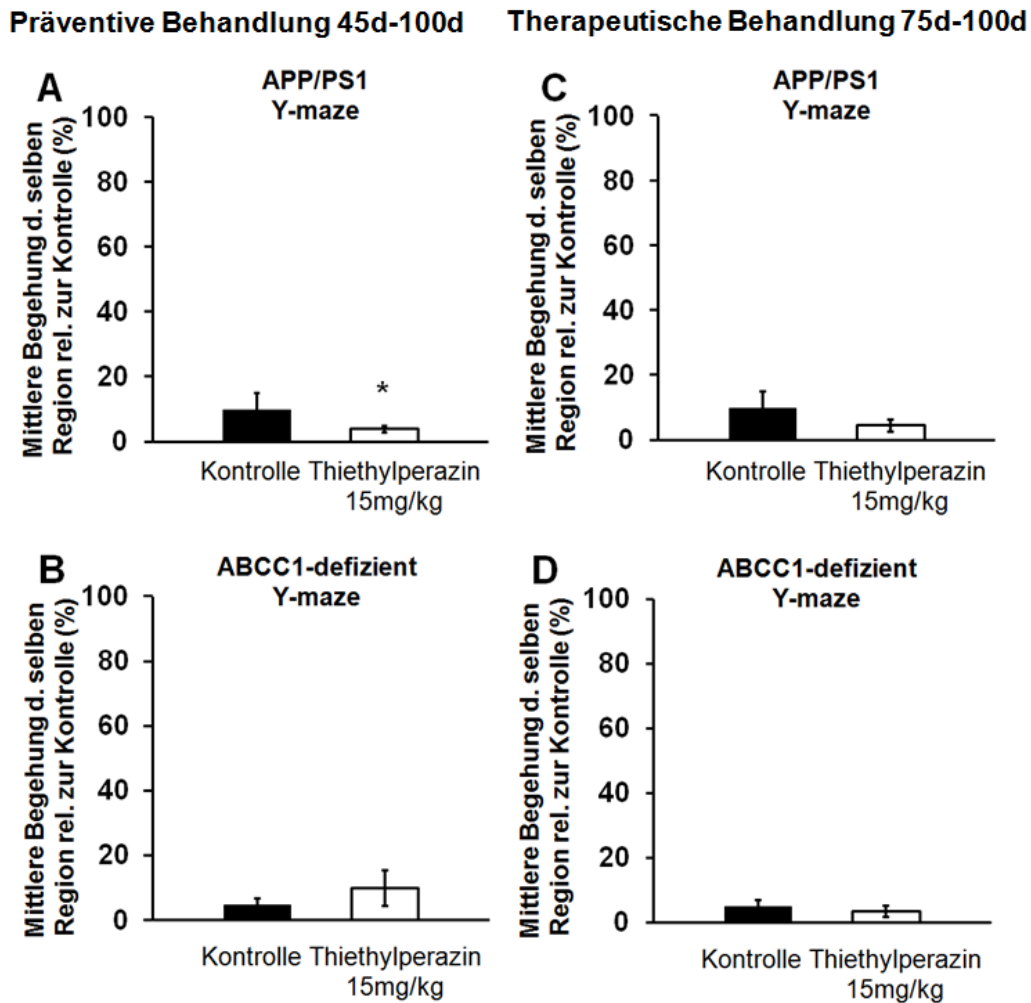


Abbildung 22: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin hat einen Einfluss auf die Kognition. (A und B) Es erfolgt eine tägliche, orale Applikation von 15mg/kg KG Thiethylperazin über einen Zeitraum von 55 Tagen ab einem Alter von 75 Tagen. (A) Durch die Aktivierung von ABCC1 zeigen APP/PS1-Tiere signifikant verbesserte kognitive Fähigkeiten im Y-Maze, (B) während APP/PS1xABCC1^{-/-}-Mäuse keine Unterschiede in ihrem Lernverhalten gegenüber unbehandelten APP/PS1xABCC1^{-/-}-Kontrollen desselben Alters zeigen. (C und D) Die Tiere werden über einen Zeitraum von 25 Tagen ab einem Alter von 75 Tagen täglich mit 15mg/kg KG Thiethylperazin behandelt. (C) Die Länge der Behandlung reicht in behandelten APP/PS1-Tieren nicht aus, um signifikante Verbesserungen in der Kognition hervorzurufen. (D) Die untersuchten APP/PS1xABCC1^{-/-}-Negativ-Kontrollen zeigen keine verbesserte Kognition im Y-Maze Test im Vergleich zu unbehandelten APP/PS1xABCC1^{-/-}-Kontrollen. Fehlerbalken zeigen SEM. (n≥4; *P<0,05).

Präventive Gaben von Thiethylperazin über einen Zeitraum von 55 Tagen zeigen dagegen deutliche Unterschiede zwischen behandelten APP/PS1-Tieren und ihren gleichaltrigen Kontrollen. Die behandelten Tiere weisen eine signifikant verbesserte Kognition auf, da sie 60% weniger häufig in die vormals bereits besuchten Arme zurückkehren, sondern alternieren (s. Abb. 22A) im Vergleich zu den Kontrollen.

Zur Kontrolle der Funktionsweise des Thiethylperazins und seiner aktivierenden Wirkung auf den ABC-Transporter ABCC1 erfolgen die Verhaltensanalysen ebenfalls in den ABCC1-defizienten Tieren. Diese zeigen, dass weder behandelte APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tiere noch ihre

gleichaltrigen Kontrollen signifikante Unterschiede in Bezug auf wiederholte Besuche desselben Armes im Y-Maze aufweisen (s. Abb. 22B, 22D). Was im Umkehrschluss die Vermutung zulässt, dass die Verbesserung der Kognition in behandelten APP/PS1-Tieren mit der Induktion von ABCC1 und einer daraus resultierenden geringeren A β -Akkumulationsrate im Gehirn der behandelten Tiere einhergeht.

5.4.2.4 Auswirkungen der Thiethylperazin Behandlung auf die kortikale Neuronenbedeckung

Eine fortschreitende Hirnatrophie gilt als eines der Hauptmerkmale der AD. Induziert wird diese durch einen stetigen Synapsen- und Neuronenverlust, ausgelöst, laut Amyloid-Hypothese, durch die Akkumulation toxischen Amyloids. Histopathologisch können Unterschiede in der kortikalen Neuronenbedeckung über immunhistochemische Färbungen mittels NeuN deutlich gemacht werden.

Anschließend Untersuchungen der immunhistochemisch gefärbten Schnitte machen deutlich, dass es durch eine Behandlung mit Thiethylperazin zu starken Veränderungen in der Neuronenfläche der untersuchten Kortextbereiche zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gibt. Diese zeigen, dass präventiv behandelte Tiere um 20% erhöhte kortikale Neuronenbedeckungen aufweisen (s. Abb. 23A). Ebenfalls untersuchte ABCC1-defiziente Negativ-Kontrollen zeigen für keine der gewählten Behandlungsformen Veränderungen zwischen unbehandelten und behandelten Tieren (s. Abb. 23B, 23D).

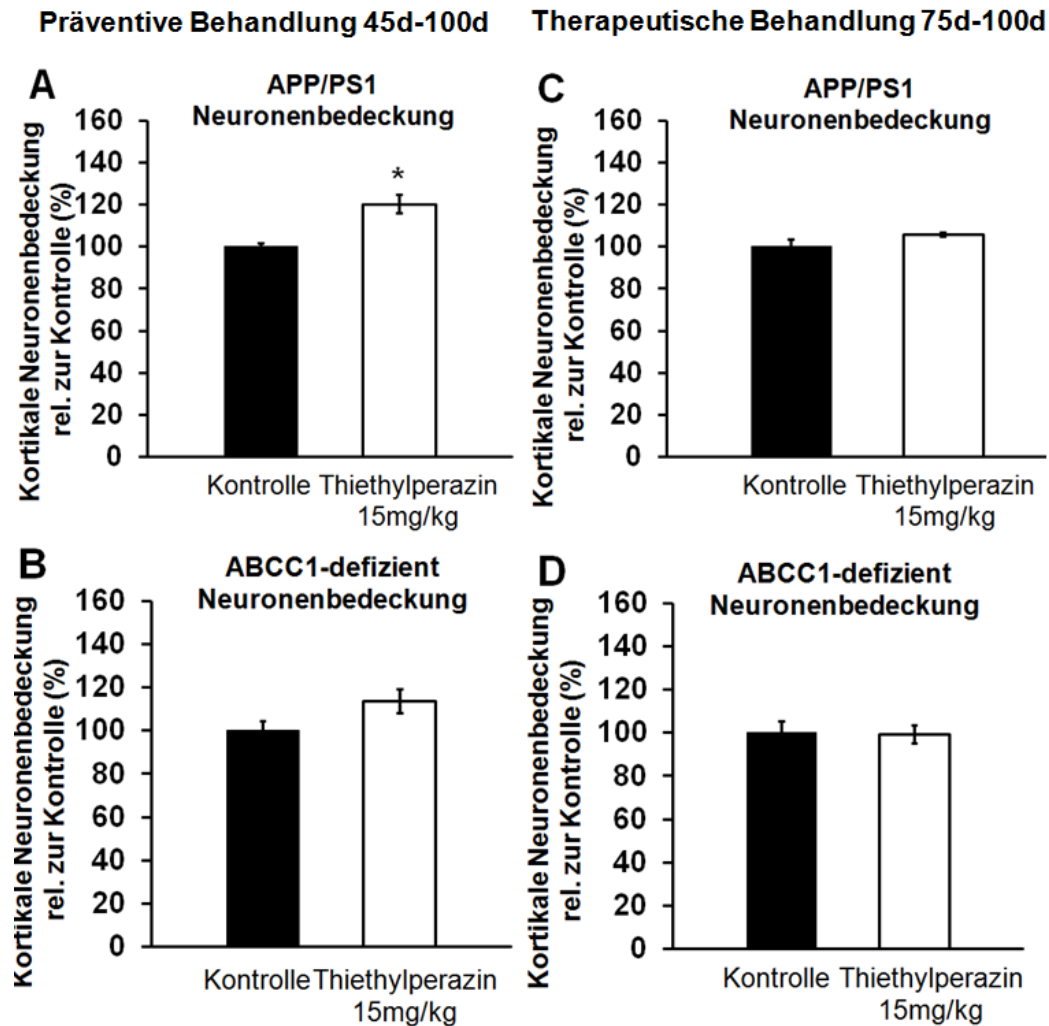


Abbildung 23: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin hat einen Einfluss auf die kortikale Neuronenbedeckung. (A und B) Die Tiere werden über einen Zeitraum von 55 Tagen ab einem Alter von 45 Tagen täglich mit 15mg/kg KG Thiethylperazin behandelt. (A) Dies führt in behandelten APP/PS1-Tieren zu einer Erhöhung der kortikalen Neuronenbedeckung um 20%. (B) In APP/PS1xABCC1^{-/-}-Kontrollen sind keine Änderungen messbar. (C und D) Die Tiere werden über einen Zeitraum von 25 Tagen ab einem Alter von 75 Tagen täglich mit 15mg/kg KG Thiethylperazin behandelt. (C) Die Dauer der Behandlung reicht nicht aus, um die kortikale Neuronenbedeckung in APP/PS1-Tieren signifikant zu beeinflussen. (D) In APP/PS1xABCC1^{-/-}-Kontrollen sind keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren messbar. Fehlerbalken zeigen SEM. (n≥4; *P<0,05).

5.4.3 Behandlung von APP/PS1 Tieren mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten

Um den bereits angeführten inhibierenden Effekt des Thiethylperazins ^(110, 111) auf ABCB1 näher zu untersuchen, werden ebenfalls Tiere mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten analysiert. Hierzu geprüfte APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tiere ermöglichen einen Ausschluss sekundärer Effekte anderer Transporter und die Analyse des reinen Effekts von Thiethylperazin auf ABCC1. Wiederum werden die Tiere auf ihre A β 40- und A β 42-Akkumulationsraten hin untersucht.

5.4.3.1 Auswirkungen der Thiethylperazin Behandlung auf die A β 40 Gehalte

Die Behandlung der APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tiere äußert sich ebenfalls in einer signifikant verringerten A β 40-Konzentration nach einer 25tägigen therapeutischen Behandlung beginnend mit einem Alter der Tiere von 75 Tagen. So zeigen sich in der Guanidin-löslichen Fraktion Reduktionen von 60% gegenüber unbehandelten APP/PS1-Kontrollen (s. Abb. 24A) und in der Puffer-löslichen Fraktion Reduktionen um 55% (s. Abb. 24B).

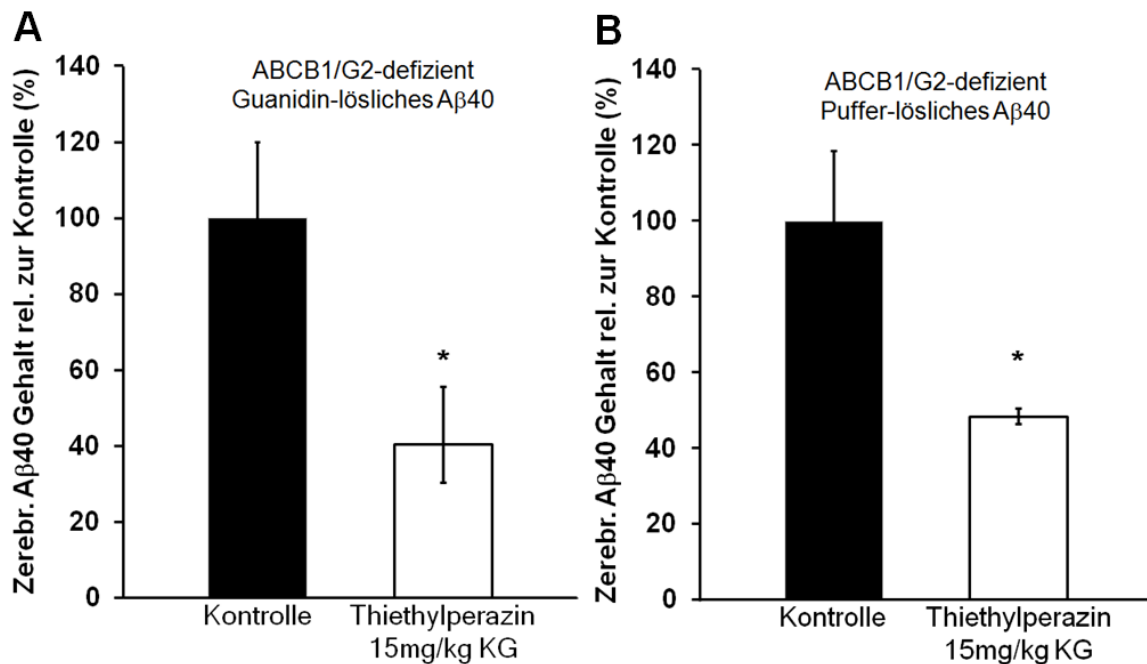


Abbildung 24: Eine therapeutische Behandlung mit Thiethylperazin hat einen reduzierenden Effekt auf die zerebrale A β 40-Konzentration. (A und B) Die Tiere werden über einen Zeitraum von 25 Tagen täglich mit 15mg/kg KG Thiethylperazin behandelt ab einem Alter von 75 Tagen. Thiethylperazin, als ABCC1-Aktivator und ABCB1-Inhibitor ist in der Lage in APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tieren, sowohl die Konzentration an Puffer-löslichem A β 40, als auch an Guanidin-löslichem

A β 40 signifikant zu reduzieren. Fehlerbalken zeigen SEM. (n \geq 4; *P<0.05). (M. Krohn und C. Lange *et al.* ⁽¹²³⁾).

5.4.3.2 Auswirkungen der Thiethylperazin Behandlung auf die A β 42 Gehalte

Die Thiethylperazin-Gaben erfolgen wiederum nach dem Muster einer präventiven und einer therapeutischen Therapieoption. Messungen ergeben, dass eine Induktion von ABCC1 zu einer signifikanten Reduktion der A β 42-Gehalte führt.

Tiere, welche präventiv behandelt werden, zeigen in der Guanidin-löslichen Fraktion Reduktionen von 74% (s. Abb. 25A). Auch die therapeutische Behandlung zeigt signifikante Unterschiede. So reduziert sich der gemessene A β 42-Gehalt in der Puffer-löslichen Fraktion um 65% und in der Guanidin-löslichen Fraktion sogar um 73% im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen (s. Abb. 25C-D). Diese Reduktionen lassen darauf schließen, dass sich die Wirkung des Thiethylperazins unter Ausschluss sekundärer Effekte noch verstärken lässt und dass die gemessene Reduktion der A β 42-Gehalte alleine auf die Aktivierung des ABC-Transporters ABCC1 zurückzuführen ist.

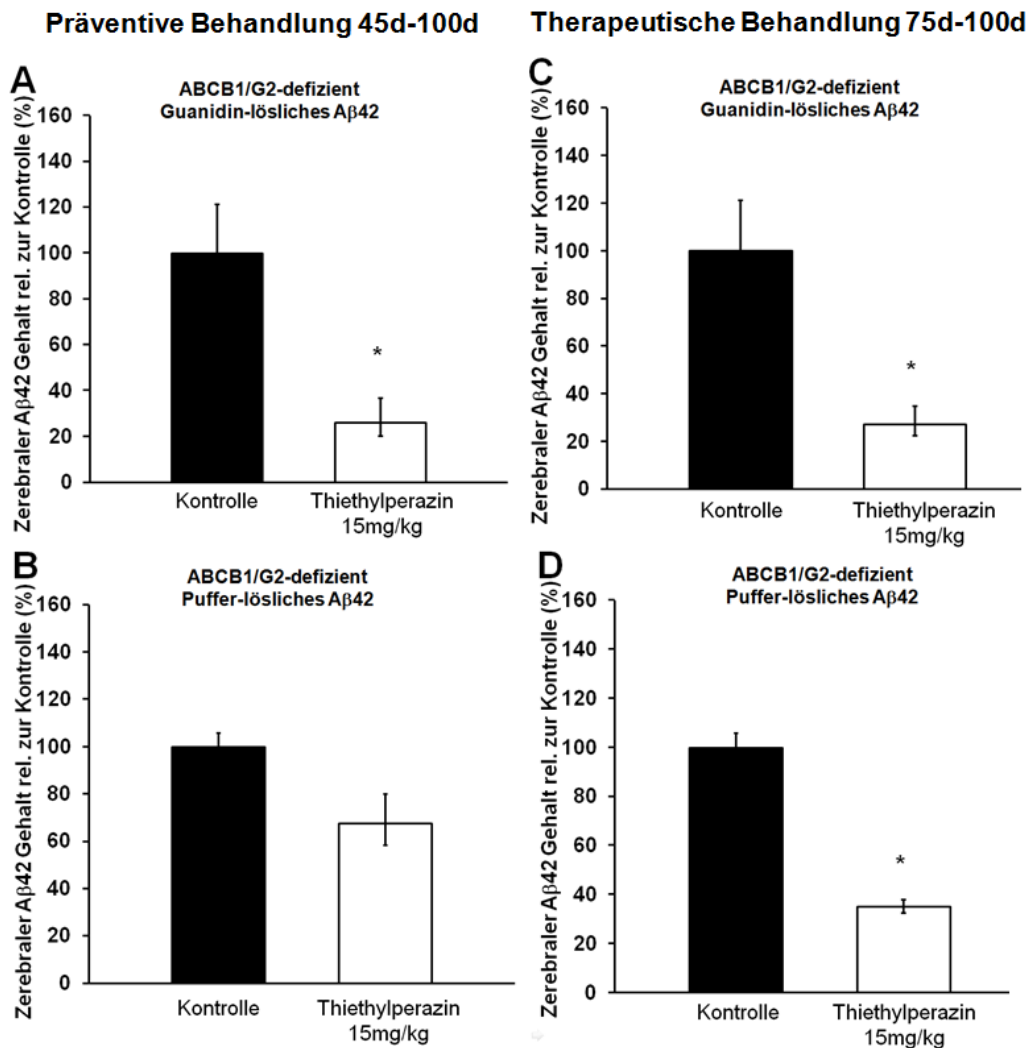


Abbildung 25: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin Behandlung führt zu einer Reduktion im Aβ42-Gehalt von APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tieren. (A und B) Die Behandlung der Tiere erfolgt über einen Zeitraum von 55 Tagen, beginnend ab Tag 45 mit 15mg/kg KG Thiethylperazin täglich. (A) Die Aktivierung von ABCC1 reduziert den Aβ-Gehalt in APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Tieren in der Guanidin-löslichen Fraktion signifikant um 74%. (B) Eine signifikante Reduktion der Puffer-löslichen Fraktion konnte nicht ermittelt werden. (C und D) Tägliche orale Applikationen von 15mg/kg KG Thiethylperazin ab einem Alter von 75 Tagen über einen Zeitraum von 25 Tagen führen (C) zu einer signifikanten Reduktion der Aβ-Gehalte in der Guanidin-löslichen Fraktion um 73%, ebenso wie (D) in der Puffer-löslichen Fraktion (65%) durch eine Induktion von ABCC1. Fehlerbalken zeigen SEM. (n≥5; *P<0.05).

5.4.4 Behandlung von APP/PS1 Tieren im genetischen C57BL/6 Hintergrund

Mausmodelle des FVB/N Hintergrundstammes weisen eine Homozygotie für das *Pde6b*^{rd1} Allel auf, dies führt bereits in einem frühen Entwicklungsstadium der Tiere zu einer retinalen Degeneration. Auf Grund ihrer frühen Sehbeeinträchtigungen sind Tiere dieses Mausstammes nicht für alle Verhaltensanalysen optimal geeignet. Mausmodelle des genomischen Hintergrundstammes C57BL/6 zeigen keine Veränderungen dieser Art. Dieser Fakt und die Unterschiede im Besatz von ABC-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke beider Mausstämmen ⁽¹²²⁾ bedingen die Analyse von Tieren des reinen, genomischen C57BL/6 Hintergrundes. Zum einen zur Herausarbeitung ihrer A β -Akkumulationsraten und deren Beeinflussbarkeit durch Thiethylperazin, sowie zum anderen, der ausführlichen Untersuchung kognitiver Unterschiede behandelter und nicht behandelter Tiere. Die Behandlungsformen gleichen denen der Tiere des FVB/N Hintergrundstammes.

5.4.4.1 Auswirkungen der Thiethylperazin Behandlung auf die A β 42 Gehalte

Zunächst erfolgt die Untersuchung der Tiere auf ihre A β 42-Akkumulationsraten hin. Die Ergebnisse der täglichen Behandlung mit 15mg/kg KG Thiethylperazin über einen Zeitraum von 55 Tagen zeigen Reduktionen in der Guanidin-löslichen Fraktion behandelter APP/PS1-B6 Mäuse. Die A β -Akkumulation verringert sich zwar um 71%, aber durch die Streuung in den Daten der gleichaltrigen APP/PS1-B6 Kontrollen kann keine Signifikanz ermittelt werden. Die signifikante Reduktion der Puffer-löslichen Fraktion beläuft sich auf 35% (s. Abb. 26A-B). Eine therapeutische Behandlung mit Thiethylperazin führt zur signifikanten Reduktion der amyloiden Ablagerungen um 83% in der Guanidin-löslichen Fraktion im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrolltieren (s. Abb. 26C). In der Puffer-löslichen Fraktion erfolgt eine Reduktion um 44% (s. Abb. 26D).

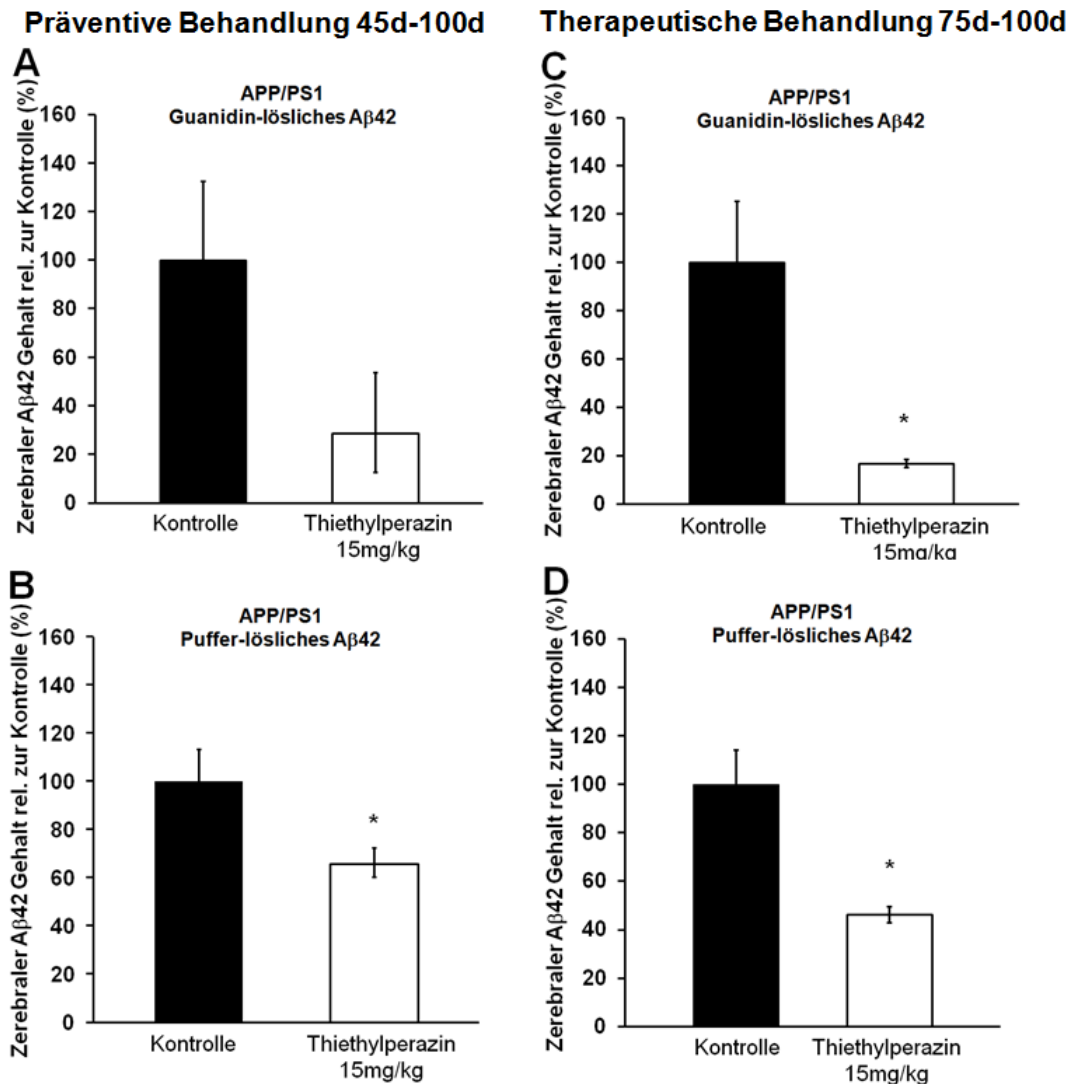


Abbildung 26: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin Behandlung reduziert die Aβ-Akkumulationsrate in APP/PS1-B6 Tieren. (A und B) Mäuse werden einmal täglich mit 15mg/kg KG Thiethylperazin ab einem Alter von 45 Tagen über einen Zeitraum von 55 Tagen behandelt. (A) Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin führt nicht zu einer signifikanten Reduktion der Ablagerungen in der Guanidin-löslichen Fraktion. (B) Aber in der Puffer-löslichen Fraktion zu einer signifikanten Verringerung um 35%. (C und D) Den Tieren wird einmal täglich 15mg/kg KG Thiethylperazin oral appliziert, ab einem Alter von 75 Tagen über eine Zeitspanne von 25 Tagen. (C) Die Aktivierung von ABCC1 mit Hilfe von Thiethylperazin reduziert die Aβ-Ablagerungen in der Guanidin-löslichen Fraktion um 83% (D) und um 44% in der Puffer-löslichen Fraktion. Fehlerbalken zeigen SEM. (n≥3; *P<0.05).

5.4.4.2 Einfluss der Thiethylperazin Behandlung auf das Verhalten der Tiere

5.4.4.2.1 Y-Maze Analysen

Die Verhaltensanalysen der behandelten Tiere im Y-Maze ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen therapeutisch behandelten APP/PS1-B6 Tieren und ihren gleichaltrigen Kontrollen. Obwohl diese 25tägige Kurzzeitbehandlung ausreicht, um bereits signifikante Unterschiede in der A β -Akkumulation (s. Abb. 26C-D) in den Gehirnen der Mäuse zu erreichen, ist die Dauer der Behandlung nicht ausreichend, um verbesserte kognitive Fähigkeiten im Bereich der Umwelterforschung aufzuzeigen (s. Abb. 27C). Es muss davon ausgegangen werden, dass eine längere Behandlung von Nöten ist, um die kognitiven Fähigkeiten zu verbessern oder auf einem stabilen Niveau zu halten und gleichzeitig negative Begleiterscheinungen wie Depressionen abzumildern. Die längerfristige, präventive Behandlung der Tiere zeigt ein signifikant verbessertes Umwelt-Erkundungsverhalten gegenüber unbehandelten Kontrollen. Gemessene Tiere gehen 70% weniger häufig in vormals bereits besuchte Arme zurück und zeigen, dass sich eine Ausweitung des Behandlungszeitraums positiv auswirkt (s. Abb. 27A).

5.4.4.2.2 Morris Watermaze Analysen

Prädestiniert zur Prüfung einer verbesserten Gedächtnisleistung von Versuchstieren ist, neben Untersuchungen im Y-Maze, im Besonderen das Morris Watermaze. Hierbei handelt es sich nicht um einen ‚Spontan-Versuch‘, sondern um ein gezieltes Training der Tiere. Sie lernen dabei sich in einem Raum zu orientieren, anhand visueller Erkennungspunkte. Je schneller der Lernerfolg der Tiere, umso besser ist die Funktion ihres Erinnerungsvermögens. Dies äußert sich im Laufe der Trainingseinheiten durch eine verringerte Latenz beim Finden der, für die Tiere, unsichtbaren Plattform. Eine 55tägige präventive Behandlung führt bereits am zweiten Tag zu einer verringerten Latenz um 65% gegenüber dem ersten Tag. Am dritten Tag kommt es nochmals zu einer Verbesserung um 15% gegenüber dem Vortag und zu einer 30% geringeren Latenz gegenüber den Kontrollen desselben Tages (s. Abb. 27B). Diese Daten gehen einher mit den gemessenen, verringerten A β 42-Akkumulationsraten und dem verbesserten Erkundungsverhalten im Y-Maze. Auch eine therapeutische Behandlung mündet in einer signifikant verbesserten Latenz am dritten Tag um 70% gegenüber dem ersten Tag und einer 20%igen Verbesserung gegenüber den getesteten Kontrollen desselben Tages (s. Abb. 27D), während im Y-Maze nach diesem Behandlungszeitraum noch keine sichtbaren Erfolge im Erkundungsverhalten der Tiere ausgemacht werden können.

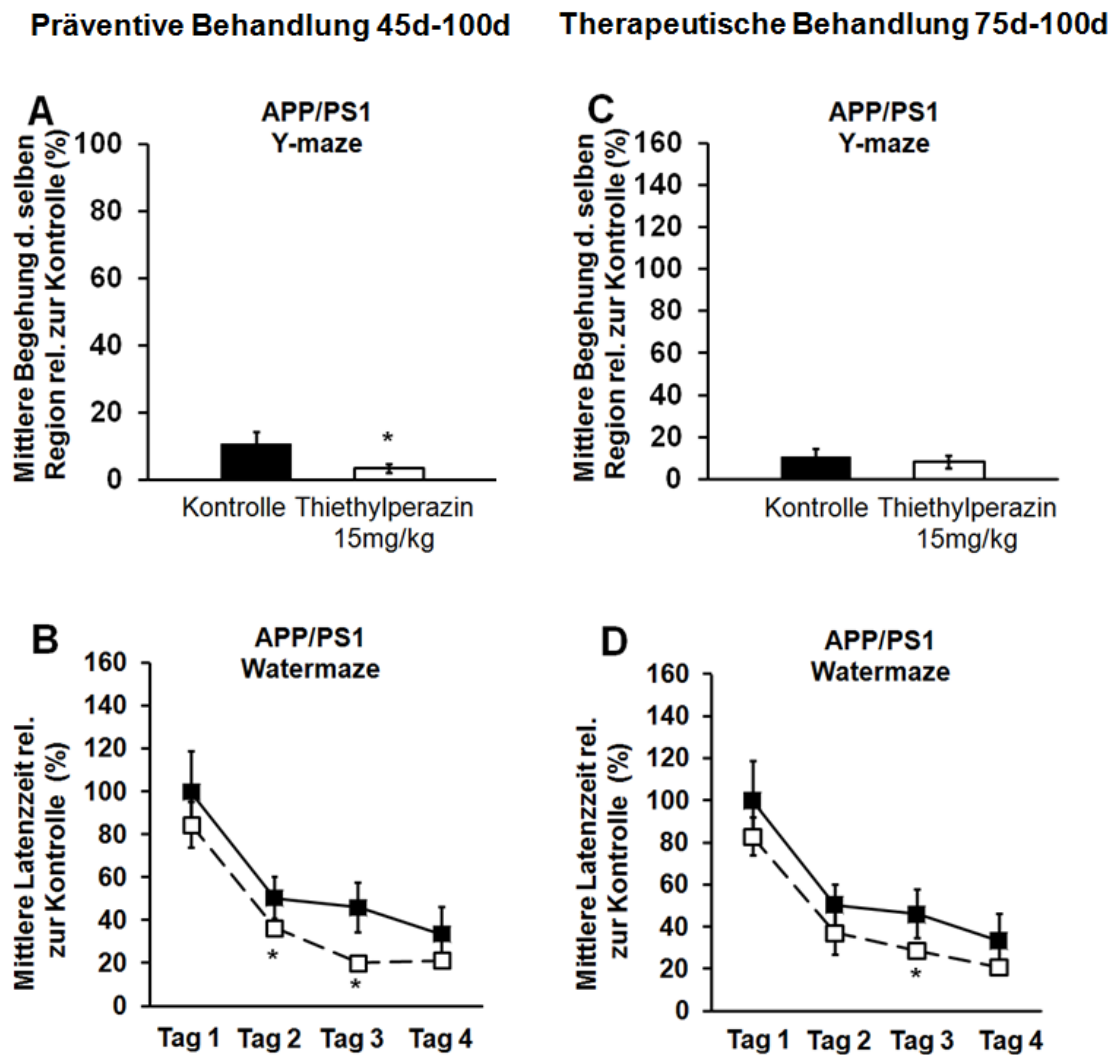


Abbildung 27: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin Behandlung hat einen positiven Einfluss auf die Kognition in APP/PS1-B6 Tieren. (A und B) Die Behandlung erfolgt ab einem Alter von 45 Tagen über einen Zeitraum von 55 Tagen mit einer täglichen, oralen Gabe von 15mg/kg KG Thiethylperazin. Durch die Behandlung mit Thiethylperazin und einer damit verbundenen Aktivierung von ABCC1 zeigen Tiere in Verhaltenstests verbesserte kognitive Fähigkeiten, welche sich durch (A) ein verbessertes Umwelt Erkundungsverhalten im Y-Maze zeigt und (B) im Watermaze durch eine verringerte Latenz. Durch die Aktivierung von ABCC1 über Thiethylperazin zeigen behandelte Tiere (gestrichelte Linie) signifikant verbesserte Resultate im Morris Watermaze im Vergleich zu APP/PS1-Kontrollen (schwarze Linie). (C und D) Die Gabe von 15mg/kg KG Thiethylperazin täglich erfolgt als 25tägige, therapeutische Kurzzeitgabe ab einem Alter von 75 Tagen. (C) Dies führt nicht zu verbesserten Resultaten im Y-Maze (D) Aber über einen Zeitraum von vier Tagen zu einer verringerten Latenz im Morris Watermaze. APP/PS1-Kontrollen – schwarze Linie, behandelte APP/PS1-Tiere – gestrichelte Linie. Fehlerbalken zeigen SEM. (n≥3; *P<0,05).

5.4.4.3 Auswirkungen der Thiethylperazin Behandlung auf die kortikale Neuronenbedeckung

Neben den Verhaltensanalysen zeigt sich der positive Erfolg durch die Behandlung mit Thiethylperazin auch in der kortikalen Neuronenbedeckung. Sowohl präventiv behandelte Tiere, als auch therapeutisch behandelte Tiere weisen signifikant erhöhte Neuronenbedeckungen in den untersuchten Kortexbereichen auf. Während diese bei 55tägiger Gabe von Thiethylperazin um 51% erhöht ist (s. Abb. 28A), zeigen sich nach der 25tägigen Behandlung um 35% induzierte kortikale Neuronenbedeckungsraten (s. Abb. 28B).

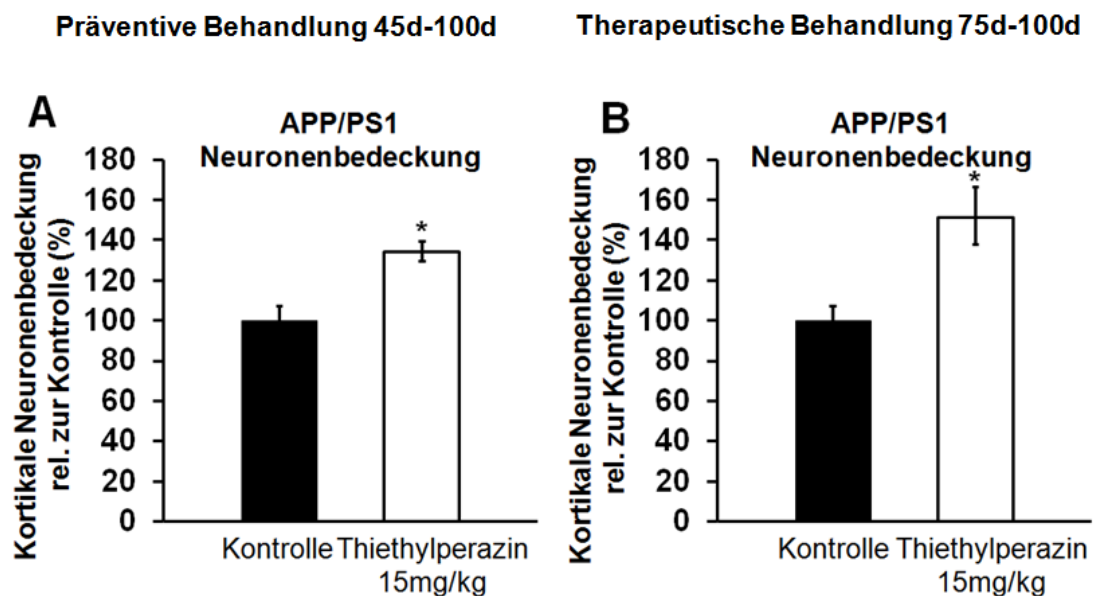


Abbildung 28: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin Behandlung hat einen positiven Einfluss auf die kortikale Neuronenbedeckung in APP/PS1-B6 Tieren. (A) Die Behandlung erfolgt ab einem Alter von 45 Tagen über einen Zeitraum von 55 Tagen mit einer täglichen, oralen Gabe von 15mg/kg KG Thiethylperazin. Gleichzeitig ist eine um 35% erhöhte kortikale Neuronenbedeckung in behandelten APP/PS1-B6 Tieren nachweisbar. **(B)** Die Gabe von 15mg/kg KG Thiethylperazin täglich erfolgt als 25tägige, therapeutische Kurzzeitgabe ab einem Alter von 75 Tagen. Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin Behandlung führt zu einer vermehrten kortikalen Neuronenbedeckung in behandelten APP/PS1-B6 Tieren um 51% gegenüber den gleichaltrigen, unbehandelten Kontrollen. Fehlerbalken zeigen SEM. (n≥3; *P<0,05).

6. Diskussion

6.1 Die Alzheimer Demenz als multifaktorielle Erkrankung des zentralen Nervensystems

Mechanismen, welche der AD-Pathogenese zu Grunde liegen, sind bis heute weitestgehend unbekannt. Genetische Faktoren wie Mutationen in den bekannten Alzheimer Genen oder Veränderungen in Genen, die mit der Alzheimer Demenz in Verbindung gebracht werden, spielen eine untergeordnete Rolle, da sie nur circa 1% der Fälle ausmachen. Die Ursachen der sporadischen Alzheimer Demenz sind multifaktoriell. Lebenswandel, Umwelteinflüsse und die Einnahme pharmazeutischer Erzeugnisse werden oft als Marker für die Ausprägung der Erkrankung genannt. Der größte Risikofaktor für eine sporadisch auftretende Form der Alzheimer Demenz ist aber immer noch das Alter. Mit zunehmendem Alter und steigender Lebenserwartung der Bevölkerung, steigt auch das Risiko an einer Demenz zu erkranken, an.

Mitochondrien, welche ATP als Energiequelle der Zellen zur Verfügung stellen, weisen mit zunehmendem Alter morphologische Veränderungen auf, was zu Beeinträchtigungen im Energiemetabolismus führen kann, in Form von oxidativem Stress. Ursächlich für diese Veränderungen sind oftmals Mutationen in der Mitochondrien DNA, ausgelöst durch eine Zunahme der Bildung freier Radikale. Bedingt durch den gestörten Metabolismus entwickelt sich ein Kreislauf, der wiederum die Vermehrung der freien Radikale fördert ⁽¹³⁵⁾ und zu einer Reduktion der ATP-Produktion führt ⁽¹³⁶⁾. Reduzierte ATP-Gehalte der Zellen können Beeinträchtigungen der Funktionsweise der Mikroglia und der ABC-Transporter bedingen.

Mikroglia, die Makrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS), machen 10% des gesamten Zellanteils im ZNS aus und dienen als Abwehrmechanismus gegen Pathogene und mögliche Verletzungen und halten somit die Homöostase aufrecht. Mit zunehmendem Alter und eingeschränkter ATP-Versorgung sind sie nicht mehr in der Lage eine konsequente A β -Phagozytose zu gewährleisten ^(126, 137, 138).

Auch die korrekte Funktionsweise der ABC-Transporter ist unter anderem an die ATP-Hydrolyse gebunden. Die Expression der ABC-Transporter erfolgt in Stammzellen vieler Gewebe. Eine Inhibition kann zu Beeinträchtigungen der Neurogenese und zu Neurofunktionellen Veränderungen führen, mit direkten Auswirkungen auf die AD-Pathogenese ⁽⁶⁵⁾.

Die ABC-Transporter der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-CSF-Barriere dienen mit ihrer asymmetrischen Anordnung als wichtige Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung

der Proteostase. Im Verlauf der Alzheimer Demenz kommt es zu einem anwachsenden Ungleichgewicht in der Proteostase mit der Folge der Anreicherung von A β hauptsächlich in Form von Oligomeren und Fibrillen ⁽¹³⁹⁻¹⁴¹⁾. Eine 2010 veröffentlichte Studie zeigt zudem, dass nicht etwa die stetige Bildung toxischen β -Amyloids, sondern mangelnder Export in der AD-Pathogenese von Bedeutung ist. Es wird gezeigt, dass in Demenzpatienten gegenüber dazu gehörenden Kontrollpersonen, zwar keine Divergenzen in der A β -Produktion messbar sind, aber, dass in Patienten mit AD der Export toxischen β -Amyloids um bis zu 30% gegenüber der Kontrollgruppe reduziert ist ^(85, 86). Bisher bekannte Mechanismen, welche die Ausfuhr des Amyloids begünstigen sind Degradationsprozesse ^(142, 143), Rezeptor-vermittelte, transzytotische Prozesse der Blut-Hirn-Schranke durch LRP1 (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1) und RAGE (Receptor for advanced End Products), sowie die perivaskuläre Drainage extrazellulärer Flüssigkeiten ⁽¹⁴⁴⁻¹⁴⁷⁾ und der aktive transmembrane Transport.

6.2 Der Einfluss der ABC-Transporter auf die Pathogenese der Alzheimer Demenz

Bislang konnten drei Mitglieder der ABC-Transporter Familie identifiziert werden, welche in der Lage sind einen A β Transport zu vermitteln ^(60, 68, 87, 88, 120, 148-151).

Studien aus dem Jahr 2009 analysierten die Einflussnahme von ABCG2 auf die AD-Pathogenese. So sind, sowohl in AD-Patienten, als auch in AD-Mausmodellen erhöhte Expressionsraten von ABCG2 in zerebralen Kapillarendothelien nachgewiesen worden. Dies bestätigte sich ebenfalls mittels *in vitro* Analysen unter A β -Zugabe. Bildgebende Untersuchungsmethoden verifizierten signifikant erhöhte A β 40-Akkumulationsraten im Gehirn von ABCG2^{-/-}-Tieren gegenüber Wildtyp-Kontrollen. Hieraus ergab sich die Hypothese, dass eine erhöhte Expression von ABCG2 als Biomarker der AD-Pathogenese dienen könnte ⁽⁸⁷⁾. Bereits im Jahr 2001 publizierte die Arbeitsgruppe von Lam *et al.* ⁽⁶⁸⁾ erstmals *in vitro* Studien, welche belegen sollten, dass der ABC-Transporter ABCB1 ein Amyloid-Efflux Transporter ist. Es ist gezeigt worden, dass ABCB1-defiziente Mausmodelle eine verminderte A β -Eliminierung aufweisen. Die hierzu durchgeführten Untersuchungen an APP-transgenen Mäusen mit eingekreuztem ABCB1-Defizit zeigen jedoch lediglich die Auswirkungen des Transporterdefizits im Alter (12 Monate). Untersuchungen über einen längeren Zeitraum sind nicht durchgeführt worden und auch auf die Rückkreuzung der Tiere in einen einheitlichen genetischen Hintergrund wurde verzichtet ⁽¹²⁰⁾. Verschiedene Studien belegen jedoch, dass der genetische Hintergrund sowohl einen Einfluss auf die A β -

Akkumulation nehmen kann ⁽¹²¹⁾, als auch, dass unterschiedliche genetische Hintergründe Einfluss auf die Expression der ABC-Transporter im Gehirn haben. Bereits im Jahr 2005 zeigten Soontornmalai *et al.* ⁽¹²²⁾, dass eindeutige Expressionsunterschiede von ABC-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke der FVB/N und der C57Bl/6 Mausstämme vorliegen. So ist unter anderem nachgewiesen worden, dass der FVB/N Mausstamm den ABC-Transporter ABCC2 nicht an der Blut-Hirn-Schranke exprimiert.

Die Rolle der ABC-Transporter Subfamilie C ist bis dato im Zusammenhang mit der Alzheimer Pathogenese noch unbeschrieben.

Die vorliegende Arbeit dokumentiert erstmals den direkten Einfluss der ABC-Transporter (ABCG2, ABCB1 und ABCC1) auf die A β -Proteostase bis zu dem Alter der Tiere von 25 Wochen in einem AD-Mausmodell mit einem einheitlichen genetischen Hintergrund. Die Folgen der Inhibition bzw. die Auswirkungen von Transporter Defiziten in diesem Modell werden diskutiert, ebenso wie die Konsequenzen, die sich aus einer Aktivierung des ABC-Transporters ABCC1 auf die A β -Akkumulation und das Verhalten von Tieren des AD-Modells ergeben.

6.2.1 Der Einfluss von ABCB1

Die vorgelegten Daten bestätigen frühere Studien ⁽⁶⁸⁾ und zeigen, dass ABCB1 ein A β -Transporteur ist. So konnte im genutzten AD-Modell nachgewiesen werden, dass in ABCB1 defizienten Tieren die A β 42-Akkumulation der Guanidin-löslichen Fraktion um das 3,5fache erhöht ist. Gleiches gilt auch für die A β 40-Spezies. Relativ zu A β 42 ist ihre Akkumulationsrate sogar noch größer. Eine Zunahme um das 4fache ist messbar gegenüber APP/PS1-Kontrollen desselben Alters (25 Wochen). Bereits im Jahr 2005 veröffentlichten Cirrito *et al.* ⁽¹²⁰⁾ Studien, welche zeigen, dass sich A β in ABCB1^{-/-}-Tieren nach voriger Injektion desselben anreichert, bereits wenige Stunden nach der Gabe im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen. Dabei konnte eine leichte Präferenz der A β 40- gegenüber den A β 42-Spezies gezeigt werden.

In einem von uns genutzten ABC-Transporter defizienten Modell ist mittels ECTA Analysen nachgewiesen worden, dass nach sechzig Minuten bereits 68% weniger A β 42 in ABCB1^{-/-}-Kulturen transportiert worden ist, gegenüber ABCB1^{+/+}-Zellen. Diese Rate sinkt nach weiteren zwei Stunden nochmals ab. Es wird nur noch 18% soviel A β 42 transportiert wie in Wildtyp Kulturen (Daten nicht gezeigt). ABCB1^{-/-}-Kulturen weisen sogar geringere Transportkapazitäten als ABCC1^{-/-}-Kulturen auf. Dies ist im Charakter der Analyse-methode

begründet. Bei den Kulturen handelt es sich um isolierte Kapillarendothelien der Blut-Hirn Schranke, dem Hauptexpressionsgebiet von ABCB1.

6.2.2 Der Einfluss von ABCC1 und des Plexus choroideus

Währenddessen wird ABCC1 hauptsächlich im Plexus choroideus exprimiert, seine Expressionsrate in Kapillarendothelien entspricht dem gegenüber nur 9%. Dennoch ist in ABCC1^{-/-}-Kulturen die Transportrate nach sechzig Minuten breits um 40% und nach weiteren sechzig Minuten um 60% reduziert gegenüber ABCC1^{+/+}-Kulturen. Dies ist auf den signifikanten Einfluss, den ABCC1 auf die A β -Proteostase hat, zurückzuführen, welcher auch *in vivo* nachgewiesen werden konnte.

Es kann erstmals indiziert werden, dass der ABC-Transporter ABCC1 Einfluss auf die A β -Akkumulation nimmt. ABCC1^{-/-} generierte AD-Mausmodelle zeigen bis zu 12fach erhöhte zerebrale A β 42-Ablagerungsraten und gleichzeitig um das 14fache erhöhte A β 40-Akkumulationen in der Guanidin-löslichen Fraktion (bestimmt mittels ELISA). Einher geht dieser rapide Anstieg zwischen 22 und 25 Wochen mit einer Absenkung der Puffer-löslichen Fraktion um 56%. Bemerkbar macht sich dies auch in signifikant erhöhten Plaquegrößen und kortikalen Plaquebedeckungen in Hirnen der untersuchten Tiere. So zeigt sich im Besonderen eine Zunahme der großen Plaques um 63%. Was Theorien untermauert, welche besagen, dass die A β -Aggregation ein konzentrationsabhängiger Prozess ist ⁽¹⁴⁰⁾ und Plaques sich innerhalb von Stunden formieren können ⁽¹⁵²⁾.

Zum Ausschluss sekundärer Effekte durchgeführte Expressionsanalysen APP-spaltender Enzymen oder A β -Proteasen zeigen keine Veränderungen, welche sich negative auf die Akkumulation des Amyloids auswirken können. So kann keine erhöhte Expressionsrate für A β -Degradationsenzyme wie NEP und IDE gefunden werden. Auch A β -Proteasen wie ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinase 10) und BACE1 zeigen keine Expressionsänderungen in den verwendeten Tiermodellen, welche die erhöhten Ablagerungsraten erklären können. Ebenso kann nachgewiesen werden, dass die Ergebnisse nicht in einer höheren Expressionsrate des APP begründet liegen oder in einer verminderten Expression von LRP1 (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1). LRP1 wird in der Literatur oft als Amyloid Efflux Transporter beschrieben ⁽¹⁵³⁻¹⁵⁶⁾. Eine verringerte Expression in ABCC1-defizienten AD-Modellen könnte somit erhöhte Ablagerungsraten bedingen. Aber in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren bewegt sich die Expression von LRP1 auf ähnlichem Niveau wie in APP/PS1-Kontrollen.

Auch eine Einflussnahme der Mikroglia kann ausgeschlossen werden. Entgegen der, in der Literatur beschriebenen reduzierten inflammatorischen Antwort in ABCC1^{-/-}-Tieren ⁽¹²⁵⁾, kann in APP/PS1xABCC1^{-/-}-Tieren die höchste Mikrogliose-Rate nachgewiesen werden. Sekundäre Effekte bekannter Herkunft sind auszuschließen und verifizieren somit den direkten Zusammenhang zwischen der Aktivität der ABC-Transporter, insbesondere ABCC1, und dem A β -Efflux.

Mit der Identifikation von ABCC1 als einem A β -Transporteur kann der Plexus choroideus als neuer Umschlagplatz für A β identifiziert bzw. bestätigt werden. Neben der Blut-Hirn-Schranke übernimmt somit auch die Blut-CSF-Barriere die Funktion des A β -Efflux. Das ist von besonderer Bedeutung, da der Plexus choroideus mit zunehmendem Alter metabolischen Veränderungen unterliegt ⁽¹⁵⁷⁾. Diese äußern sich unter anderem durch epitheliale Atrophien. Diese Entwicklung wurde früher bereits in AD-Patienten erkannt ⁽⁵²⁾. Für die Funktionsweise des Plexus choroideus können sich hierdurch Änderungen, welche die Synthese, die Sekretion und auch den Transport von Proteinen und anderen Molekülen betreffen, ergeben. ^(53, 54). Die vorgelegten Ergebnisse stützen diese Vermutungen, denn Veränderungen dieser Art hätten direkte Auswirkungen auf die Expression und die Aktivität von ABCC1, wiederum mit der Folge eines verminderten A β -Efflux in AD-Patienten.

6.2.3 Der Einfluss von ABCG2

Der ABC-Transporter ABCG2 wird sowohl in Kapillarendothelien, als auch dem Plexus choroideus exprimiert. Eine Beeinflussung des A β -Efflux durch ein Defizit von ABCG2 ist nicht nachweisbar. Es sind gegenüber den APP/PS1-Kontrollen keine Änderungen der A β 40 und A β 42-Gehalte in APP/PS1xABCG2^{-/-}-Tieren gemessen worden. Auch eine erhöhte A β -Akkumulation in Form höherer Plaqueanzahlen, Plaquegrößen oder der kortikalen Plaquebedeckungen war nicht auszumachen. Und *in vitro* sind keine verringerten Transportraten in ABCG2^{-/-}-Kulturen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Die Daten lassen vermuten, dass A β kein Substrat für ABCG2 ist und können vorangegangene Studien nicht bestätigen ⁽⁸⁷⁾. Beide Studien unterscheiden sich jedoch in den genutzten Mausmodellen und Analysemethoden. Es können auch kompensatorische Prozesse innerhalb des APP/PS1xABCG2^{-/-}-Modells für die differenzierten Ergebnisse ursächlich sein. Diesbezüglich bereits durchgeführte Versuche belegen, dass es in ABCB1^{-/-}-Tieren zu einer signifikanten Erhöhung der ABCG2 mRNA Gehalte (um das 3fache) an der Blut-Hirn-Schranke kommt. Gleichzeitig wurde in dieser Studie demonstriert, dass der Export bekannter ABCG2-

Substrate um ein vielfaches gesteigert werden konnte ⁽¹⁵⁸⁾. So wurde auf der einen Seite nachgewiesen, dass ABCG2 ein physiologischer Transporter der Blut-Hirn-Schranke ist. Aber auf der anderen Seite auch gezeigt, dass durch Ausfall oder Inhibition bedingte funktionelle Defizite anderer Transporter zu regulatorischen Kompensationen führen können.

6.3 Einflüsse kombinierter ABC-Transporter Defizite auf die A β -Akkumulation und mögliche Regulationsmechanismen

Gleiches scheint für Mehrfach-defiziente AD-Mausmodelle zu gelten. So sind durch den Wegfall weiterer Transporter in Kombination mit ABCC1 keine kumulativen Effekte nachgewiesen worden. Alle untersuchten Modelle zeigen ähnliche Ablagerungsraten, sowohl für alle A β 40-Spezies, als auch für alle A β 42-Spezies im Vergleich zu den APP/PS1-Kontrollen. Lediglich Tiere des Modells APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-} zeigen signifikante Erhöhungen ihrer A β -Gehalte zwischen 14 und 25 Wochen. Wenngleich die A β 40 und auch die A β 42-Gehalte ab einem Alter von 18 Wochen vergleichsweise nicht mehr so rapide ansteigen. Im Alter von 18 Wochen kommt es zudem zu einem sprunghaften Anstieg beider A β -Spezies in der jeweiligen Puffer-löslichen Fraktion. Verifizierbar ist dies in immunhistologischen Untersuchungen nicht. Ab einem Alter von 18 Wochen stagnieren die erhaltenen Werte zu Plaquegröße und kortikaler Plaquebedeckung, im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Modellen. Hier steigen die Zahlen weiter kontinuierlich an, bewegen sich aber stets auf gleichem Niveau zu den Kontrollen. *In vitro* können die Ergebnisse bestätigt werden. Auch hier sind für die einzelnen Stämme keine signifikanten Verschlechterungen in den Transportraten gemessen worden. Zu vermuten sind kompensatorische Effekte anderer Transportmoleküle, nicht nur der ABC-Familie, welche die Akkumulationen in allen Modellen auf einem stabilen Niveau halten. Sie würden auch erklären, warum es im APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCG2^{-/-}-Modell nach dem rapiden Anstieg in der Puffer-löslichen Fraktion (Zeitpunkt 18 Wochen) nicht zu einem nachfolgenden sprunghaften Anstieg in der Guanidin-löslichen Fraktion kommt (wie für APP/PS1xABCC1^{-/-} im Alter zwischen 22 und 25 Wochen gezeigt.). Und warum die erhaltenen Werte der Plaquesdaten ab diesem Alter stagnieren. Erste Microarray Analysen bestätigen diese Hypothese. Sie identifizieren das *Sclo1a4* Gen, welches für das Organo-Anionen-Transport Protein 1a4 kodiert und zeigen im APP/PS1xABCB1^{-/-}xABCC1^{-/-}-Modell 30fach erhöhte Expressionsraten auf. OATP 1a4 als multispezifischer Transporter der Blut-Hirn Schranke, aber auch des Plexus choroideus, könnte diese Aufgabe übernehmen. Er wird sowohl auf der luminalen, als auch auf der abluminalen Seite der Blut-Hirn Schranke exprimiert und kann dadurch, sowohl

den Blut-Gehirn, als auch den Gehirn-Blut Transport initiieren ^(47, 159). Bisher ist wenig bekannt über diesen Transporter, der in einer ganzen Reihe von Geweben exprimiert wird. Untersuchungen zur Substratspezifität gegenüber A β sind bisher nicht vorgenommen worden.

6.4 Beeinflussbarkeit von ABC-Transportern

Auswirkungen auf die Transportkapazität können von pharmazeutischen Erzeugnissen und anderen Substanzen ausgehen. Viele dieser Stoffe inhibieren ABC-Transporter ⁽¹⁶⁰⁾. Besonders diskutiert werden in diesem Zusammenhang die Einnahmen von Medikamenten wie Beta-Blocker, Antihypertensiva und Kalzium-Antagonisten, welche in Zeiten mit zunehmenden Anzahlen adipöser Patienten und Herz-Kreislauf Erkrankungen als häufigster Todesursache (lt. WHO), immer öfter und früher zum Einsatz kommen ⁽⁶⁰⁾.

6.4.1 Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin und die Wirksamkeit auf die Faktoren der Alzheimer Demenz Pathogenese

In Hinblick auf den Einfluss von ABCC1 kann mit Hilfe der vorliegenden Arbeit ein Aktivator identifiziert werden, der mittels oraler Gabe in der Lage ist, die A β -Akkumulationen im Gehirn behandelter Tiere zu reduzieren, das Verhalten zu beeinflussen und sich positiv auf die kortikale Neuronenbedeckung auszuwirken.

Mittels einer präventiven Gabe des Thiethylperazins, über einen Zeitraum von 55 Tagen, kann die A β -Akkumulation im Gehirn von AD-Mausmodellen um bis zu 60% reduziert werden, unabhängig vom genetischen Hintergrund der analysierten Tiere. Diese Reduktionen zeigen sich in beiden Fraktionen, also sowohl für die unlöslichen, als auch die löslichen A β -Spezies. Zudem kann der Effekt, sowohl für A β 40, als auch für A β 42 nachgewiesen werden, relativ zu einander betrachtet werden beide Spezies in ähnlichem Maße reduziert.

Auch therapeutische Gaben reduzieren Akkumulationen von A β um bis zu 60%. Diese Reduktionen sind, nach 25tägiger Behandlung, hauptsächlich in der Puffer-löslichen Fraktion messbar. Es kann davon ausgegangen werden, dass Reduktionen der Puffer-löslichen Fraktion stets den ersten Indikator für den Einfluss einer Behandlung darstellen. Ein gesteigerter Export äußert sich zuerst in der Puffer-löslichen Fraktion. Durch den vermehrten

Export von A β sinkt im Anschluss die Aggregationsrate. Es akkumuliert weniger fibrilläres und höher aggregiertes A β , da trotz weiterer Bildung des β -Amyloids, sein Export über das Maß der Neubildung hinaus gesteigert werden kann. Dies äußert sich dann sekundär in der Guanidin-löslichen Fraktion.

6.4.2 Der Einfluss des inhibierenden Effektes des Thiethylperazins auf ABCB1

Thiethylperazin zeigt eine publizierte inhibierende Wirkung auf ABCB1 ⁽¹¹⁰⁾. Unter Zuhilfenahme ABCB1- und ABCG2-defizienter Mausmodelle, soll der alleinige aktivierende Effekt auf ABCC1 untersucht werden. Unter Zuhilfenahme der gleichen Behandlungsstrategien, wie zuvor in anderen Modellen, ist es möglich, die A β -Akkumulation um 80% gegenüber den unbehandelten Kontrollen zu senken. Schlussfolgernd daraus kann der Effekt des Thiethylperazins in dem verwendeten Modell nochmals um 20% gesteigert werden, relativ zu den vorher gemessenen Reduktionen in APP/PS1-Modellen. Durch die scheinbar verbesserte Wirksamkeit des Medikaments war nicht nur eine Reduktion in den Puffer-löslichen Fraktionen messbar. Es ist sogar bereits nach einer 25tägigen Behandlung eine signifikante Reduktion der Guanidin-löslichen A β 42-Spezies verzeichnet worden.

Dies postuliert, dass ein verbessertes Derivat von Thiethylperazin, welches keine inhibierende Wirkung auf ABCB1 hat, selbst bei verkürzter Gabe Therapieerfolge erzielen könnte und somit eine belastende Dauermedikation, welche Nebenwirkungen auslösen kann, ausschließt.

6.4.3 Der Effekt des Thiethylperazins auf das Verhalten

Die Absenkung der Akkumulationsraten liefert keinen Hinweis auf eine erfolgreiche Therapieoption. So konnte bereits in anderen Studien, in denen eine Absenkung hauptsächlich unlöslicher A β -Spezies erreicht worden ist, keine Besserung der Demenz Symptome bei Patienten selbst bewirken ^(85, 86). Deshalb gelten vor allem die Verbesserungen kognitiver Fähigkeiten als Indiz für eine erfolgreiche Therapie.

Tiere des FVB/N Hintergrundstammes eignen sich auf Grund einer genetisch bedingten retinalen Degradation nur bedingt für Verhaltensanalysen. Dennoch können durch Behandlungen über einen Zeitraum von 55 Tagen bereits signifikante Erfolge im Erkundungsverhalten der Tiere im Y-Maze beobachtet werden. Diese Tiere gehen signifikant

weniger oft in vormals bereits besuchte Arme zurück. Kürzere, therapeutische Behandlungen zeigen keine signifikanten Verbesserungen.

Auch analysierte ABCC1-defiziente Tiere lassen im Vergleich zu ihren unbehandelten Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in ihrem Verhalten erkennen.

Gleichzeitig zeigen getestete Tiere des C57BL/6 Hintergrundstammes nachweislich, sowohl Verbesserungen der räumlichen Gedächtnisfähigkeit, als auch des Erkundungsverhaltens. Die gemessenen Verbesserungen der räumlichen Gedächtnisfähigkeit sind im Morris Watermaze bestimmt worden. Tiere dieses Mausstammes zeigen keine Beeinträchtigungen des Sehvermögens. Erste Erfolge treten bereits durch eine 25tägige Behandlung der Mäuse zu Tage. So kann die Latenz (Zeit bis zum Erreichen der Plattform) am dritten Tag um 70% gegenüber dem ersten Tag verringert werden und um 20% gegenüber den Kontrollen desselben Tages. Nach 55tägiger Behandlung erfolgt bereits am zweiten Tag eine Reduktion der Latenzzeit um 65%. Gefolgt von einer nochmaligen Verbesserung um 15% am dritten Tag. Gleichzeitig ist die Latenzzeit um 30% geringer als bei Kontrollen desselben Tages.

Verbesserungen des Erkundungsverhaltens (Y-Maze) treten auch bei APP/PS1-B6 Tieren überwiegend erst nach 55tägiger Behandlung der Tiere auf. Hier reicht eine 25tägige Kurzzeitbehandlung, welche bereits signifikant geringere A β 42-Akkumulationen zeigt, nicht aus, um auch das Erkundungsverhalten signifikant zu beeinflussen. Möglicherweise sind hier längerfristige Behandlungen von Nöten, um die kognitiven Fähigkeiten signifikant zu verbessern. Eine 55tägige Behandlung der Mäuse äußert sich bei Tieren des C57BL/6 Hintergrundstammes in einer Reduktion der wiederholten Besuche desselben Armes um 70% gegenüber den Kontrollen.

Gerade Einschränkungen in der Umwelterkundung gehen oftmals mit Depressionen einher. Über eine Aktivierung von ABCC1, einer damit einhergehenden Induktion des A β -Efflux' und einem daraus resultierenden verringerten Neuronenuntergang kann die kognitive Leistungsfähigkeit gesteigert werden. Mit der Demenz einhergehende Begleiterscheinungen, wie das Auftreten von Depressionen können abgemildert werden ^(161, 162). Dies kann sich wiederum positiv auf das Verhalten der Tiere auswirken.

6.4.4 Der Effekt der Thiethylperazin Behandlung auf die Anzahl der Neuronen

Ein direkter Einfluss auf die Anzahl der Neuronen ist messbar. Durch die Aktivierung von ABCC1 und einer simultan eintretenden Reduktion der A β 42-Akkumulation ist in den Tieren

eine erhöhte kortikale Neuronenbedeckung messbar. Sowohl präventiv, als auch therapeutisch behandelte Tiere zeigen signifikante Erhöhungen. So haben Tiere, die über 55 Tage behandelt worden sind, eine um 51% erhöhte kortikale Neuronenbedeckung in den untersuchten Kortextbereichen. Therapeutische Kurzzeitbehandlungen sorgen für erhöhte kortikale Bedeckungsraten um 35% gegenüber den Kontrollen.

Der stetige Verlust von Neuronen und Synapsen gilt als eines der neuropathologischen Hauptmerkmale in der AD Pathogenese, ausgelöst durch die Akkumulation toxischen β -Amyloids und der Hyperphosphorylierung des Tau Proteins. Dabei ist der stetige Verlust von Synapsen nicht an einen Neuronen Verlust gebunden, kann diesen aber verschlimmern. Meist geht er dem Verlust von Neuronen voraus, denn vom Synapsen Verlust betroffene Neurone verlieren zunehmend ihre Konnektivität, was den kognitiven Verfall beschleunigt ⁽¹⁶³⁾. Verschiedene veröffentlichte Studien stellten dabei bereits in der Vergangenheit einen direkten Zusammenhang zwischen dem neurotoxischen, löslichen A β und dem Synapsen Verlust her ^(161, 162, 164).

Die Konsequenz der Therapie könnte also eine Inhibition der Neuronen Nekrose und des Synapsen Verlustes sein, was zu einer Verlangsamung der Bildung von Hirnatrophien führen könnte.

6.4.5 Thiethylperazin – als Therapieoption

Es kann mit den vorgelegten Ergebnissen gezeigt werden, dass Thiethylperazin in der Lage ist, A β -Akkumulationen im Gehirn von behandelten Tieren eines AD-Mausmodells zu reduzieren. Gleichzeitig liefern die Quantifizierung der kortikalen Neuronenbedeckung und die verhaltensbiologisch gewonnenen Daten konkrete Aussagen über den kognitiven Verfall im verwendeten Mausmodell. Die bisher erzielten Resultate lassen darauf schließen, dass der stetig voranschreitende Prozess des Verfalls und der mangelnde Export von löslicher, toxischer A β -Spezies in direktem Zusammenhang zueinander stehen. Und dass eine gesteigerte A β -Entnahme aus dem System durch die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin zu einer Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit führt. Gleichzeitig aber auch zu einer Verminderung der Symptome der, mit der Demenz einhergehenden, Begleiterscheinungen wie Depressionen ^(161, 162).

Es kann aber auch gezeigt werden, dass Thiethylperazin kein ideales Medikament zur Behandlung einer Alzheimer Demenz ist, durch seinen inhibierenden Effekt auf ABCB1. In ABCB1^{-/-}-Modellen, in denen dieser Effekt nicht greifen kann, konnte die relative Reduktion amyloider Ablagerungen nochmals gesteigert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ursachen, die der Entwicklung einer Alzheimer Demenz vorausgehen, nicht auf ein einzelnes Ereignis zu reduzieren sind. Aber dass die Funktion der ABC-Transporter eine entscheidende Rolle in der Alzheimer Demenz Pathogenese spielt.

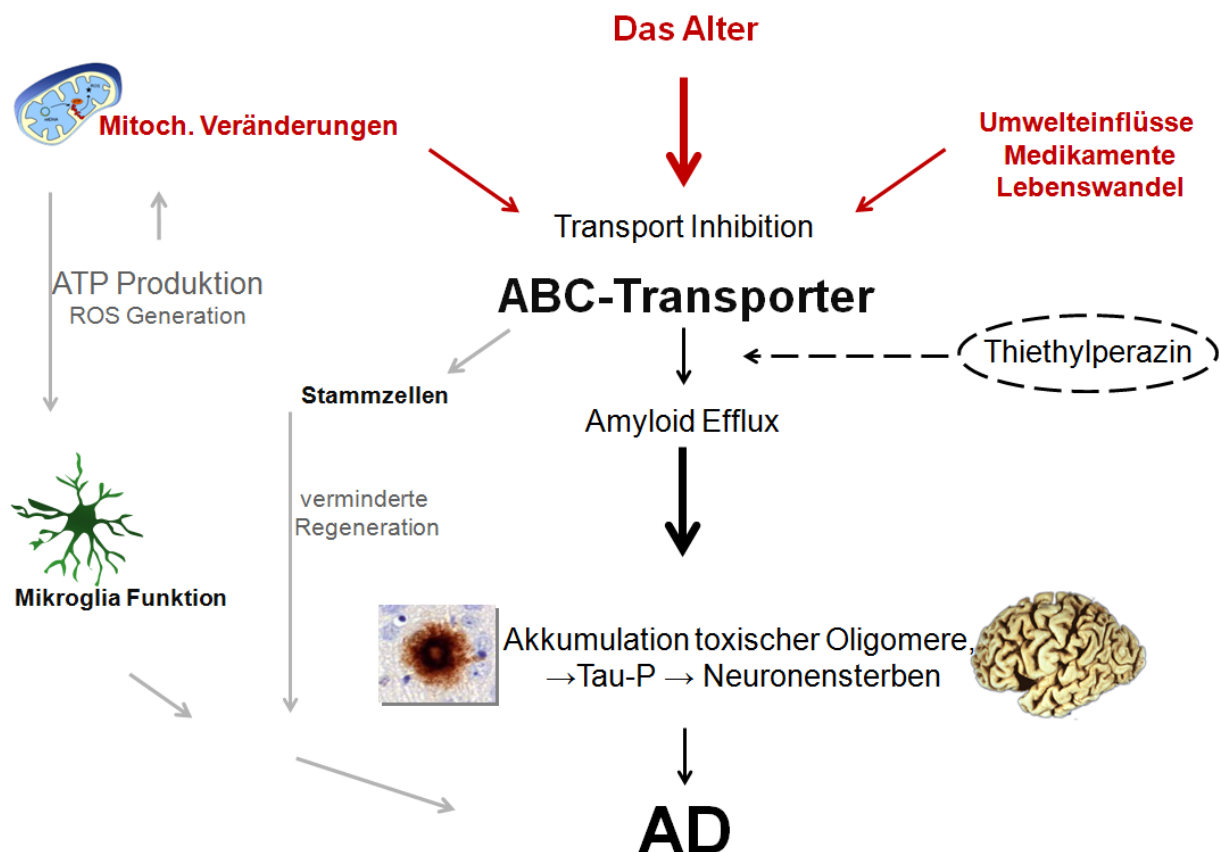


Abbildung 29: Schematische Darstellung eines vermuteten Modells zur Entwicklung einer sporadischen Form der Alzheimer Demenz. Multiple Ursachen begünstigen die Entwicklung einer sporadischen Alzheimer Demenz. Neben dem Lebenswandel, Umwelteinflüssen und Medikamenten, ist im Besonderen das Alter ein entscheidender Faktor. Es wirkt sich u.a. negativ auf Mitochondrien und ABC-Transporter aus. Veränderungen im mitochondrialen Genom werden durch eine vermehrte ROS-Produktion bedingt. Dies mündet in einem Kreislauf verminderter Funktion, weiterer ROS-Produktion und einer verminderten ATP-Produktion. Dies geht einher mit einer verminderten Mikroglia-Funktion und einer zunehmenden Transporter-Inhibition. Dies führt zur Beeinträchtigung der Neurogenese und des Regenerationspotentials und in einer kausalen Kette zur Zunahme der A β -Akkumulation durch mangelnden Export, einer vermehrten Hyperphosphorylierung des Tau Proteins und damit einhergehend zu einer Erhöhung des Sterbens von Neuronen. Thiethylperazin ist durch gezielte Aktivierung von ABCC1 in der Lage den A β -Efflux über das Maß der A β -Produktion hinaus zu induzieren und so der Amyloid-Akkumulation entgegen zu wirken. (Grafiken: mit freundlicher Genehmigung von J. Pahnke)

7. Referenzen

1. Alzheimer's Association, 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers and Dementia* **7**, 208 (2011).
2. T. L. Spires *et al.*, Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx: the Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics* **2**, 423 (2005).
3. S. Przedborski *et al.*, Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest* **111**, 3 (Jan, 2003).
4. D. M. Cosgrove, 3rd *et al.*, Aprotinin therapy for reoperative myocardial revascularization: a placebo-controlled study. *Ann Thorac Surg* **54**, 1031 (Dec, 1992).
5. S. M. Allan *et al.*, Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* **2**, 734 (Oct, 2001).
6. R. Mayeux, Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *J Clin Invest* **115**, 1404 (Jun, 2005).
7. R. C. Brown *et al.*, Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspectives* **113**, 1250 (2005).
8. S. Sarkar *et al.*, Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases. *Mol Biosyst* **4**, 895 (Sep, 2008).
9. B. Graubner, ICD-10-GM 2012 Systematisches Verzeichnis: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsproblem. *Deutscher Ärzte Verlag*, (2012).
10. J. Cummings *et al.*, Reversible dementia. Illustrative cases, definition, and review. *Jama* **243**, 2434 (Jun 20, 1980).
11. H. Frösl, Demenzatlas. *Thieme Verlag*, (2012).
12. C. P. Ferri *et al.*, Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **366**, 2112 (Dec 17, 2005).
13. Alzheimer's Disease International, World Alzheimer Report 2009. (2009).
14. M. Dugu *et al.*, Review of dementia. *Mt Sinai J Med* **70**, 45 (Jan, 2003).
15. H. Grossman *et al.*, Dementia: a brief review. *Mt Sinai J Med* **73**, 985 (Nov, 2006).
16. Alzheimer's Association, 2010 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **6**, 74 (2010).
17. A. Alzheimer, Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiat. Psych.-Gerichtl. Med.* **64**, 3 (1907).
18. F. R. Verhey, Alois Alzheimer (1864-1915). *Journal of neurology* **256**, 502 (Mar, 2009).

19. K. A. Jellinger, Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research. *J Neural Transm* **113**, 1603 (Nov, 2006).
20. Alzheimer's Association, 2008 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **4**, 110 (Mar, 2008).
21. H. Bickel, [Dementia in advanced age: estimating incidence and health care costs]. *Z Gerontol Geriatr* **34**, 108 (Apr, 2001).
22. www.census.gov.
23. H. Forst *et al.*, Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **249**, 288 (1999).
24. A. Lowin *et al.*, Alzheimer's disease in the UK: comparative evidence on cost of illness and volume of health services research funding. *Int J Geriatr Psychiatry*, (2001).
25. J. Pahnke, Könnte es Alzheimer sein? . *Thieme Verlag*, (2008).
26. Y. H. Su *et al.*, Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev* **54**, 469 (Sep, 2002).
27. B. D. Greenberg *et al.*, Toward an integrated discovery and development program in Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis. *Neurobiol Aging* **15 Suppl 2**, S105 (1994).
28. C. Reitz, Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int J Alzheimers Dis* **369808**. Epub, (2012).
29. J. A. Hardy *et al.*, Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184 (1992).
30. D. J. Selkoe, The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **6**, 487 (Apr, 1991).
31. R. O. Weller *et al.*, Cerebral amyloid angiopathy in the aetiology and immunotherapy of Alzheimer disease. *Alzheimer's research & therapy* **1**, 6 (2009).
32. S. Love *et al.*, Insights into the pathogenesis and pathogenicity of cerebral amyloid angiopathy. *Frontiers in bioscience* **1**, 4778 (2009).
33. G. Thinakaran *et al.*, Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* **283**, 29615 (Oct 31, 2008).
34. A. Y. Hung *et al.*, Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9439 (Oct 15, 1992).
35. D. J. Selkoe, Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**, 741 (Apr, 2001).
36. D. M. Kovacs *et al.*, Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med* **2**, 224 (Feb, 1996).

37. D. R. Borchelt *et al.*, Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* **17**, 1005 (Nov, 1996).
38. W. T. Kimberly *et al.*, The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem* **275**, 3173 (Feb 4, 2000).
39. C. J. Barrow *et al.*, *Abeta Peptides and Alzheimer's Disease*. (Springer, 2007), vol. 1.
40. E. L. Jones *et al.*, Amyloid beta concentrations in older people with Down syndrome and dementia. *Neurosci Lett* **451**, 162 (2009).
41. P. D. Metha *et al.*, Increased amyloid beta protein levels in children and adolescents with Down syndrome. *J Neurol Sci* **254**, 22 (2007).
42. W. J. Strittmatter *et al.*, Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1977 (Mar 1, 1993).
43. J. E. Donahue *et al.*, Apolipoprotein E, amyloid-beta, and blood-brain barrier permeability in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**, 261 (Apr, 2008).
44. W. Loscher *et al.*, Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family. *Neurorx* **2**, 86 (Jan, 2005).
45. W. Loscher *et al.*, Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* **6**, 591 (Aug, 2005).
46. B. Bauer *et al.*, Coordinated nuclear receptor regulation of the efflux transporter, Mrp2, and the phase-II metabolizing enzyme, GSTpi, at the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 1222 (Jun, 2008).
47. A. Ose *et al.*, Functional characterization of mouse organic anion transport peptide 1a4 in the uptake and efflux across the blood-brain barrier. *Drug Metab Dispos* **38**, 168 (2010).
48. B. Gao *et al.*, Organic anion transport across the choroid plexus. *Microsc Res Tech* **1**, 60 (2001).
49. H. Sun *et al.*, Drug efflux transporters in the CNS. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 83 (Jan 21, 2003).
50. S. Choudhuri *et al.*, Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol* **25**, 231 (Jul-Aug, 2006).
51. T. Speake *et al.*, Mechanisms of CSF secretion by the choroid plexus. *Microsc Res Tech* **52**, 49 (2001).
52. X. Alvira-Botero *et al.*, Clearance of amyloid- β peptide across the choroid plexus in Alzheimer's disease. *Current Aging Science* **3**, 219 (2010).
53. J. M. Serot *et al.*, Morphological alterations of the choroid plexus in late-onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* **99**, 105 (2000).

54. A. Krzyzanowska *et al.*, Pathological alteration in choroid plexus of Alzheimer's disease: implication for a new therapy approaches. *Front Pharmacol* **3**, (2012).
55. D. F. Emerich *et al.*, The choroid plexus: function, pathology and therapeutic potential of its transplantation. *Expert Opin Biol Ther* **4**, 1191 (2004).
56. C. F. Higgins, ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67 (1992).
57. P. Borst *et al.*, Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* **71**, 537 (2002).
58. M. Dean *et al.*, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**, 1007 (Jul, 2001).
59. J. Pahnke *et al.*, The role of blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer dementia--implications for immunological therapies for plaque dissolution. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* **77 Suppl 1**, S21 (Aug, 2009).
60. J. Pahnke *et al.*, Clinico-pathologic function of cerebral ABC transporters - implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **5**, 396 (Aug, 2008).
61. M. R. Alison, Tissue-based stem cells: ABC transporter proteins take centre stage. *The Journal of pathology* **200**, 547 (Aug, 2003).
62. M. O. Islam *et al.*, Characterization of ABC transporter ABCB1 expressed in human neural stem/progenitor cells. *FEBS Lett* **579**, 3473 (Jul 4, 2005).
63. M. O. Islam *et al.*, Functional expression of ABCG2 transporter in human neural stem/progenitor cells. *Neurosci Res* **52**, 75 (May, 2005).
64. T. Lin *et al.*, ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis - a different perspective. *Cell Res* **16**, 857 (Nov, 2006).
65. T. Schumacher *et al.*, ABC Transporters B1,C1 and G2 Differentially Regulate Neuroregeneration in Mice. *PloS one* **7**, e35613 (2012).
66. K. Sterz *et al.*, Activators of P-glycoprotein: Structure-activity relationships and investigation of their mode of action. *ChemMedChem* **4**, 1897 (2009).
67. D. J. Begley, ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des* **10**, 1295 (2004).
68. F. C. Lam *et al.*, beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem* **76**, 1121 (Feb, 2001).
69. P. Borst *et al.*, A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1295 (Aug 16, 2000).
70. S. P. Cole *et al.*, Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human cancer cell line. *Science* **258**, 1650 (1992).
71. D. M. Hermann *et al.*, Implications of ATP-binding cassette transporters for brain pharmacotherapies. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 128 (2007).

72. A. Minn *et al.*, Drug transport into the mammalian brain: the nasal pathway and its specific metabolic barrier. *J Drug Target* **10**, 285 (Jun, 2002).
73. J. A. Nicolazzo *et al.*, Drug transport across blood-brain barrier and the impact of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Curr Top Med Chem.* **9**, 130 (2009).
74. T. Litman *et al.*, The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* **113** (Pt 11), 2011 (Jun, 2000).
75. C. Ozvegy *et al.*, Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 111 (Jul 6, 2001).
76. L. A. Doyle *et al.*, A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15665 (Dec 22, 1998).
77. P. Krishnamurthy *et al.*, Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**, 381 (2006).
78. J. Hardy *et al.*, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353 (Jul 19, 2002).
79. J. R. Cirrito *et al.*, In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J Neurosci* **23**, 8844 (Oct 1, 2003).
80. S. Lesné *et al.*, A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352 (Mar 16, 2006).
81. Y. M. Kuo *et al.*, High levels of circulating Abeta42 are sequestered by plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 787 (Apr 21, 1999).
82. E. Matsubara *et al.*, Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Ann Neurol* **45**, 537 (Apr, 1999).
83. R. B. DeMattos *et al.*, Plaque-associated disruption of CSF and plasma amyloid-beta (Abeta) equilibrium in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **81**, 229 (Apr, 2002).
84. I. H. Cheng *et al.*, Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem* **282**, 23818 (Aug 17, 2007).
85. K. G. Mawuenyega *et al.*, Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* **330**, 1774 (Dec 24, 2010).
86. R. J. Bateman, Amyloid-beta production and clearance rates in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* **6**, S101 (2010).
87. H. Xiong *et al.*, ABCG2 is upregulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for Abeta(1-40) peptides. *J Neurosci* **29**, 5463 (Apr 29, 2009).

88. D. Kuhnke *et al.*, MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1) Mediates Transport of Alzheimer's amyloid-beta peptides--implications for the mechanisms of Abeta clearance at the blood-brain barrier. *Brain Pathol* **17**, 347 (Oct, 2007).
89. A. Rajagopal *et al.*, Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Mol Biol Cell* **14**, 3389 (Aug, 2003).
90. H. Volk *et al.*, Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables. *J Histochem Cytochem* **53**, 517 (Apr, 2005).
91. H. A. Volk *et al.*, Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures. *Neuroscience* **123**, 751 (2004).
92. G. Lee *et al.*, Functional expression and localization of P-glycoprotein in the central nervous system: relevance to the pathogenesis and treatment of neurological disorders. *Pharm Res* **21**, 1313 (Aug, 2004).
93. F. Schlachetzki *et al.*, P-glycoprotein and caveolin-1alpha in endothelium and astrocytes of primate brain. *Neuroreport* **14**, 2041 (Nov 14, 2003).
94. G. Lee *et al.*, Functional expression of P-glycoprotein in rat brain microglia. *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 204 (Oct, 2001).
95. M. H. Donovan *et al.*, Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* **495**, 70 (Mar 1, 2006).
96. A. K. Ghosh *et al.*, beta-Secretase as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **5**, 399 (Jul, 2008).
97. M. S. Wolfe, Gamma-secretase inhibition and modulation for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **5**, 158 (Apr, 2008).
98. J. M. Orgogozo *et al.*, Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* **61**, 46 (Jul 8, 2003).
99. C. Holmes *et al.*, Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* **372**, 216 (Jul 19, 2008).
100. D. Boche *et al.*, Consequence of Abeta immunization on the vasculature of human Alzheimer's disease brain. *Brain* **131**, 3299 (Dec, 2008).
101. H. Braak *et al.*, Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* **82**, 239 (1991).
102. C. McCoy *et al.*, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the MDR1 promoter is mediated by EGR1. *Mol Cell Biol* **15**, 6100 (1995).
103. I. Rusiecka *et al.*, Induction of the multixenobiotic/multidrug resistance system in various cell lines in response to perfluorinated carboxylic acids. *Acta Biochimica Polonica* **55**, 329 (2008).
104. D. G. Teotico *et al.*, Structural basis of human pregnane X receptor activation by the hops constituent colupulone. *Mol Pharmacol* **74**, 1512 (2008).

105. K. Linde *et al.*, St John's wort depression - an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ* **313**, 253 (1996).
106. T. Mennini *et al.*, The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. *Life Sci* **75**, 1021 (2004).
107. S. Vogelgesang *et al.*, Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics* **12**, 535 (Oct, 2002).
108. S. Zhou *et al.*, Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* **36**, 57 (Feb, 2004).
109. K. Dastmalchi *et al.*, Plants as Potential Sources for Drug Development against Alzheimer's Disease. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science* **1**, 83 (2007).
110. O. Wesolowska *et al.*, Differential effect of phenothiazines on MRP1 and P-glycoprotein activity. *In vivo (Athens, Greece)* **23**, 943 (Nov-Dec, 2009).
111. O. Wesolowska, Interaction of phenothiazines, stilbenes and flavonoids with multidrug resistance-associated transporters, P-glycoprotein and MRP1. *Acta Biochimica Polonica* **58**, 433 (2011).
112. www.drugs.com.
113. A. H. Schinkel, P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* **36**, 179 (Apr 5, 1999).
114. A. H. Schinkel *et al.*, Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* **77**, 491 (May 20, 1994).
115. A. H. Schinkel, The roles of P-glycoprotein and MRP1 in the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Adv Exp Med Biol* **500**, 365 (2001).
116. M. Assem *et al.*, Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J Biol Chem* **279**, 22250 (May 21, 2004).
117. A. H. Schinkel *et al.*, Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4028 (Apr 15, 1997).
118. J. D. Allen *et al.*, The mouse *Bcrp1/Mxr/Abcp* gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res* **59**, 4237 (Sep 1, 1999).
119. R. Radde *et al.*, Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* **7**, 940 (Sep, 2006).
120. J. R. Cirrito *et al.*, P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* **115**, 3285 (Nov, 2005).

121. E. J. Lehman *et al.*, Genetic background regulates beta-amyloid precursor protein processing and beta-amyloid deposition in the mouse. *Hum Mol Genet* **12**, 2949 (Nov 15, 2003).
122. A. Soontornmalai *et al.*, Differential, strain-specific cellular and subcellular distribution of multidrug transporters in murine choroid plexus and blood-brain barrier. *Neuroscience* **138**, 159 (2006).
123. M. Krohn *et al.*, Cerebral amyloid-beta proteostasis is regulated by the membrane transport protein ABCC1 in mice. *J Clin Invest* **121**, 3924 (Oct 3, 2011).
124. J. W. Jonker *et al.*, The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15649 (Nov 26, 2002).
125. J. Wijnholds *et al.*, Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med* **3**, 1275 (Nov, 1997).
126. K. Scheffler *et al.*, Determination of Spatial and Temporal Distribution of Microglia by 230nm-High-Resolution, High-Throughput Automated Analysis Reveals Different Amyloid Plaque Populations in an APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* **8**, 781 (Jan 19, 2011).
127. P. F. Chinnery *et al.*, Point mutations of the mtDNA control region in normal and neurodegenerative human brains. *American journal of human genetics* **68**, 529 (Feb, 2001).
128. C. Coisne *et al.*, Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **85**, 734 (Jun, 2005).
129. A. Siflinger-Birnboim *et al.*, Selectivity of the endothelial monolayer: effects of increased permeability. *Microvasc Res* **36**, 216 (Nov, 1988).
130. R. Morris, Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* **11**, 47 (1984).
131. John's Hopkins University, Neurogenetics and Behavior Center, USA (Methode adaptiert).
132. C. D. Conrad *et al.*, The effects of type I and type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behavior and spatial memory in the Y-maze. *Brain Res* **759**, 76 (Jun 6, 1997).
133. L. Holcomb *et al.*, Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* **4**, 97 (Jan, 1998).
134. S. Burgold *et al.*, In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks. *Acta Neuropathol* **121**, 327 (Mar, 2011).
135. V. Rhein *et al.*, Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20057 (Nov 24, 2009).

136. K. Scheffler *et al.*, Mitochondrial DNA polymorphisms specifically modify cerebral β -amyloid proteostasis. *Acta Neuropathologica* **Equb ahead of print**, (2012).
137. A. R. Simard *et al.*, Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* **49**, 489 (Feb 16, 2006).
138. S. A. Frautschy *et al.*, Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol* **152**, 307 (Jan, 1998).
139. W. E. Balch *et al.*, Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* **319**, 916 (Feb 15, 2008).
140. D. J. Selkoe, Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* **32**, 177 (Oct 25, 2001).
141. H. W. Querfurth *et al.*, Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* **362**, 329 (Jan 28, 2010).
142. E. Wong *et al.*, Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, a006734 (2010).
143. M. M. Lipinski *et al.*, Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14164 (Jul 26, 2010).
144. R. Deane *et al.*, RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* **9**, 907 (Jul, 2003).
145. R. Deane *et al.*, RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* **35**, 2628 (Nov, 2004).
146. J. Pahnke *et al.*, Alzheimer's disease and blood-brain barrier function-Why have anti-beta-amyloid therapies failed to prevent dementia progression? *Neuroscience and biobehavioral reviews* **33**, 1099 (Jul, 2009).
147. R. O. Weller *et al.*, Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **18**, 253 (Apr, 2008).
148. A. M. Hartz *et al.*, Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* **77**, 715 (May, 2010).
149. S. Vogelgesang *et al.*, The role of P-glycoprotein in cerebral amyloid angiopathy; implications for the early pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **1**, 121 (May, 2004).
150. R. Koldamova *et al.*, Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J Biol Chem* **280**, 43224 (Dec 30, 2005).
151. R. Koldamova *et al.*, The role of ATP-binding cassette transporter A1 in Alzheimer's disease and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* **180**, 824 (2010).
152. M. Meyer-Luehmann *et al.*, Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* **451**, 720 (Feb 7, 2008).

153. O. M. Andersen *et al.*, Lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **29**, 687 (2006).
154. R. Deane *et al.*, The role of the cell surface LRP and soluble LRP in blood-brain barrier Abeta clearance in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* **14**, 1601 (2008).
155. B. Naze *et al.*, LRP promotes endocytosis and degradation, but not transcytosis, of the amyloid-beta peptide in a bloodö-brain barrier in vitro model. *Neurobiol Dis* **30**, 94 (2008).
156. T. Pflanzner *et al.*, LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid-beta across the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging*, (Jul 12, 2010).
157. J. M. Serot *et al.*, Choroid plexus, aging of the brain, and Alzheimer's disease. *Front Biosci* **8**, s515 (May 1, 2003).
158. S. Cisternino *et al.*, Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res* **64**, 3296 (May 1, 2004).
159. G. Hartmann *et al.*, Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia. *J Pharmacol Exp Ther* **303**, 273 (2002).
160. C. H. Lee, Reversing agents for ATP-binding cassette drug transporters. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* **596**, 325 (2010).
161. W. Xia, Brain amyloid β protein and memory disruption in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric disease and treatment* **7**, 605 (2010).
162. A. Lord *et al.*, Amyloid-beta protofibril levels correlate with spatial learning in Arctic Alzheimer's disease transgenic mice. *The FEBS journal* **276**, 995 (2009).
163. A. Serrano-Pozo *et al.*, Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **1**, a006189 (2011).
164. L. F. Lue *et al.*, Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **155**, 853 (Sep, 1999).

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb. – Abbildung

ABC-Transporter – ATP-binding-cassette Transporter

A β – Amyloid- β

A β *56 – A β Star 56

AD – Alzheimer Demenz

ADAM10 – engl. a disintegrin and metalloproteinase 10

ApoE – Apolipoprotein E

APLP1/2 – engl. Amyloid Precursor-like Protein 1/2

APP – engl. Amyloid Precursor Protein - Amyloid Vorläufer Protein

App – APP Gen

AS – Aminosäuren

ATP – Adenosintriphosphat

BACE – engl. β -site APP cleaving enzyme

BCA – engl. bicinchoninic acid

BCRP – engl. Breast Cancer Resistance Protein

bFGF – engl. Basic fibroblast growth factor

BCSFB – Blut-Cerebrospinalflüssigkeits-Barriere

BGB – Bundesgesetzbuch

BHS – Blut-Hirn-Schranke

BSA – Bovines Serum Albumin

bzw. – beziehungsweise

ca. – circa

CAA – zerebrale Amyloidangiopathie

CO₂ – Kohlendioxid

CSF – Cerebrospinalflüssigkeit

dd – doppelt destilliert

DEPC – Diethylpyrocarbonat

DMEM – engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimethylsulfoxid

DNA – Desoxyribonucleinsäure

DLK – Demenz mit Lewy Körperchen

ECL – engl. enhanced chemiluminescence

ECTA – Endothelial Cell Transwell Assay

EDTA – Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure

ELISA – enzyme-linked immuno-sorbent assay
et al. – et alteri
FAD – familiäre Alzheimer Demenz
g – Erdbeschleunigung ($g=9,81\text{m/s}^2$)
GSH – Glutathion (g-L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycin)
GuaHCl – Guanidin-Hydrochlorid
h – Stunden
hAPP^{swe} – humanes APP - schwedische Mutation
HBSS – engl. Hank's Buffered Salt Solution
HCl – Salzsäure
Hepes – Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
H₂O – Wasser
IBA1 – Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IDE – Insulin Degradationsenzym
IgG – Immunglobulin G
IHC – Immunhistochemie
kDA – KiloDalton
KE – Kapillarendothelien
kg – Kilogramm
KG – Körpergewicht
LALLF – Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei
LLC-PK1 – engl. Pig Kidney cell line
LRP1 – engl. Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1
M – Molarität; marginal
MCF-7 – Michigan Cancer Foundation – 7 – Brustkrebs Zelllinie
MDR1 – engl. Multi Drug Resistance 1
mg – Milligramm
Mg – Magnesium
min – Minuten
mM – millimolar
mRNA – messenger Ribonucleinsäure
MRP1 – Multidrug Resistance-associated Protein 1
n - Anzahl
Na₂CO₃ – Natriumcarbonat
NaHCO₃ – Natriumhydrogencarbonat
NaCl – Natriumchlorid
ND – Neurodegeneration

NEM-GS – N-ethylmaleimide-GS

NEP – Neprilisin

NeuN – Neuronal Nuclei

NFT – Neurofibrilläre Tangles (Bündel)

ng – Nanogramm

nm – Nanometer

nM – nanomolar

NMDA-Rezeptor – N-methyl-D-Aspartat Säure Rezeptor

OATP 1a4 – Organo-Anionen-Transporter Protein 1a4

PC – Plexus choroideus

PFA – Paraformaldehyd

pH – negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität

P-gp – P-glykoprotein

PMSF – engl. phenylmethylsulfonyl fluoride

PS1 – Presenilin1

PS2 – Presenilin2

PVDF – Polyvinylidenfluorid

RAGE – engl. Receptor for advanced end products

RGB – Rot-Grün-Blau Profil

RNA – Ribonucleinsäure

ROI – Region of Interest

ROS – reaktive Sauerstoff Spezies

rpm – Rotationen pro Minute

RT – Raumtemperatur

s. – siehe

Sclo1a4 – Gen – engl. solute carrier organic anion transporter family, member 1a4

SDS – engl. sodium dodecyl sulfate

SEM – Standardfehler des Mittelwertes

Sf9-Zellen – *Spodoptera frugiperda* Zellen

TBS – engl. tris-buffered saline

TBST – engl. tris-buffered saline – 0,1% Tween-20

u.a. – unter anderem

V – Volt

VD – Vaskuläre Demenzen

W – Wochen

WBA – engl. Wash Buffer A

WBB – engl. Wash Buffer B

WT – Wildtyp

z.B. – zum Beispiel

ZNS – Zentrales Nervensystem

°C – Grad Celsius

µl – Mikroliter

% – Prozent

9. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Beispiele für Veränderungen bei Patienten mit Alzheimer Demenz..... | 13 |
| Abbildung 2: Prozessierung des APP durch α -, β - und γ -Sekretase. | 15 |
| Abbildung 3: Aufbau der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke und die Verteilung der ABC-Transporter innerhalb der Barrieren..... | 17 |
| Abbildung 4: Chemische Zusammensetzung und Aufbau des Thiethylperazins. | 24 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung der Isolation von Kapillarendothelzellen aus Maushirnen..... | 36 |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung eines in vitro Blut-Hirn-Schranken Modells..... | 38 |
| Abbildung 7: Expressionsanalyse und Lokalisation von ABCB1, ABCC1, sowie ABCG2 in Kapillarendothelzellen (KE) und Epithelzellen des Plexus choroideus (PC)..... | 45 |
| Abbildung 8: ABCC1-Defizit fördert die A β -Ablagerungsraten. | 47 |
| Abbildung 9: Quantifizierung amyloider Ablagerungen unter Verwendung immunhistochemischer Analysen..... | 49 |
| Abbildung 10: Altersabhängige A β 40-Konzentrationen bestimmt durch ELISA Messungen in APP/PS1 Modellen mit eingekreuzten einfach ABC-Transporter Defiziten..... | 51 |
| Abbildung 11: Altersabhängige A β 42-Konzentrationen bestimmt durch ELISA Messungen in APP/PS1 Modellen mit eingekreuzten einfach ABC-Transporter Defiziten..... | 53 |
| Abbildung 12: Unterschiede in der APP Prozessierung sind nicht verantwortlich für eine beschleunigte A β -Akkumulationen in APP/PS1xABCB1 ^{-/-} - und APP/PS1xABCC1 ^{-/-} -Tieren..... | 55 |
| Abbildung 13: Die mikrogliale Dichte steigt mit zunehmender A β -Konzentration. | 56 |
| Abbildung 14: Die fehlende Expression von ABCC1 verringert die A β 42-Transportrate in vitro. | 57 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 15: Quantifizierung amyloider Ablagerungen unter Verwendung immunhistochemischer Analysen..... | 59 |
| Abbildung 16: Altersabhängige A β 40-Konzentrationen bestimmt durch ELISA Messungen in APP/PS1 Modellen mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten im Vergleich zu APP/PS1xABCC1 ^{-/-} und Kontrollen.. | 61 |
| Abbildung 17: Altersabhängige A β 42-Konzentrationen bestimmt durch ELISA Messungen in APP/PS1-Modellen mit kombinierten ABC-Transporter Defiziten im Vergleich zu APP/PS1xABCC1 ^{-/-} und Kontrollen.. | 63 |
| Abbildung 18: Die fehlende Expression anderer ABC-Transporter im Zusammenhang mit ABCC1 führt nicht zu reduzierten A β 42-Transportraten in vitro..... | 64 |
| Abbildung 19: Thiethylperazin verstärkt die ABCC1 Transport-Aktivität.)..... | 66 |
| Abbildung 20: Eine therapeutische Behandlung mit Thiethylperazin hat einen reduzierenden Effekt auf die zerebrale A β 40-Konzentration in APP/PS1-Tieren. | 68 |
| Abbildung 21: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin reduziert die A β -Akkumulation. | 69 |
| Abbildung 22: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin hat einen Einfluss auf die Kognition.. | 71 |
| Abbildung 23: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin hat einen Einfluss auf die kortikale Neuronenbedeckung. | 73 |
| Abbildung 24: Eine therapeutische Behandlung mit Thiethylperazin hat einen reduzierenden Effekt auf die zerebrale A β 40-Konzentration..... | 74 |
| Abbildung 25: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin Behandlung führt zu einer Reduktion im A β 42-Gehalt von APP/PS1xABCB1 ^{-/-} xABCG2 ^{-/-} -Tieren. | 76 |
| Abbildung 26: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin-Behandlung reduziert die A β -Akkumulationsrate in APP/PS1-B6 Tieren..... | 78 |
| Abbildung 27: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin Behandlung hat einen positiven Einfluss auf die Kognition in APP/PS1-B6 Tieren..... | 80 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 28: Die Aktivierung von ABCC1 mittels Thiethylperazin Behandlung hat einen positiven Einfluss auf die kortikale Neuronenbedeckung in APP/PS1-B6 Tieren. | 81 |
| Abbildung 29: Schematische Darstellung eines vermuteten Modells zur Entwicklung einer sporadischen Form der Alzheimer Demenz. | 92 |

10. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Unterteilung und Charakteristik der am häufigsten vorkommenden Demenzerkrankungen. | 11 |
| Tabelle 2: Übersicht zu verwendeten Tierzahlen einfach-defizienter Mausstämme. | 29 |
| Tabelle 3: Übersicht zu verwendeten Tierzahlen mehrfach-defizienter Mausstämme. | 30 |
| Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Tierzahlen zur Thiethylperazin Behandlung. | 30 |
| Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Tierzahlen, welche zur Kontrolle mit einer adäquaten Menge an H ₂ O behandelt worden sind. | 31 |

11. Erklärung

nach §4 Abs. 1 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock.

Ich versichere hiermit an Eides statt, das ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 15.06.2012

12. Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name: Cathleen Lange, Dipl. Biologin

Geboren: 11.06.1983 in Rostock

Familienstand: ledig, 1 Kind (Alter 10 Monate)

Beruflicher Werdegang

1994-2003: Abitur; Johann-Heinrich-von-Thünen Gymnasium; Rostock

2003-2009: Biologie Studium, Universität Rostock

2008-2009: Diplomarbeit zum Thema: Function of Blood-Brain Barrier ABC Transporters in Mouse Models of Alzheimer's Disease; Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Zentrum für Neurologie, Klinik für Neurologie, Neurodegeneration Research Lab

2009: Forschungsaufenthalt an der Unité mixte Université d'Artois, Institut Pasteur de Lille, Lens (Frankreich)

Seit 2009: Promotion zum Thema: Der Einfluss des Blut-Hirn-Schranken ABC-Transporters ABCC1 auf die Pathogenese der Alzheimer Demenz; Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Zentrum für Neurologie, Klinik für Neurologie, Neurodegeneration Research Lab

2009-2012: Stipendium der Landesgraduiertenförderung des Landes Mecklenburg Vorpommern an der Universität Rostock

Veröffentlichungen

- Poster I: A Mathematical model for the aggregation and transport of Amyloid-beta through the Blood-Brain-Barrier, (2008)
- Poster II: Combined Nepilysin and ABC-Transporter knockout mice show behavioural alterations and histopathological disturbances, (2009)
- Presentation: Function of ABC Transporters for the Pathogenesis of Ideopathic AD; *Baltic Winter School*, (2009)
- Abstract: Role of ABC-Transporters in the pathogenesis of Alzheimer's Disease
- Paper I: Cerebral amyloid- β proteostasis is regulated by the membrane transport protein ABCC1 in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121 (10), 3924-31, (2011)
- Paper II: Determination of spatial and temporal distribution of microglia by 230nm-high-resolution, high-throughput automated analysis reveals different amyloid populations in APP/PS1 mouse models of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 8 (7), 781-8, (2011)
- Paper III: ABC transporters B1, C1 and G2 differentially regulate neuroregeneration in mice. *PLoSone*, 7 (4), (2012)

13. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Jens Pahnke für die langjährige gute Zusammenarbeit, die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen und meine eigenen Ideen umzusetzen. Ich danke Ihnen für Ihre konstruktive Kritik, Ihre stetige Hilfe und Unterstützung, Ihren Einsatz und für Ihr Verständnis.

Auch danke ich Prof. Reinhard Schröder für seine Bereitschaft und volle Unterstützung.

Diese Arbeit wurde erst ermöglicht mit Hilfe eines Stipendiums der Landesgraduierföderung Mecklenburg-Vorpommern.

Ich danke dir, Markus, für deinen unermüdlichen Einsatz, die Beziehung zwischen Excel und mir nachhaltig zu verbessern. Ich kann dir so viel sagen, du bist nicht gescheitert! Beste Freunde werden wir zwei wohl nie werden, aber ohne dich hätte ich diese Beziehung wohl schon längst beendet.

Jacqueline, ich danke dir für Vieles. Es aufzuschreiben, würde das Füllen ganzer Seiten, das Schreiben ganzer Romane, aber wohl auch das Enthüllen vieler, nennen wir sie mal, ‚Unglaublichkeiten‘ bedeuten. Das möchte ich an dieser Stelle vermeiden. Aber lass mich sagen, dass Fahrrad fahren und Schaukeln nie wieder das Gleiche bedeuten werden.

Ich danke dem gesamten Labor für die Unterstützung. Ohne gegenseitige Hilfe und Teamarbeit wäre Vieles nicht möglich!

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Manu, von dir habe ich bekommen, was immer gerade nötig war. Eine Schulter, einen Tritt, ein Ohr zum Zuhören oder auch mal zwei und immer aufbauende Worte. Mutti, du hast mir das kostbarste gegeben, was ich brauchte, Zeit. Ohne wäre es überhaupt nicht möglich gewesen, diese Arbeit fertigzustellen. In bessere Hände hätte ich Emma nicht geben können. Und jetzt ist es geschafft. Ich werde Dir dafür niemals genug danken können!

Und zum Schluss und am aller wichtigsten, Emma und Stefan. Auch wenn Emma nicht unbedingt eine Hilfe war, besonders nicht, wenn sie mit meinem Laptop-Kabel spielen wollte. So seid ihr doch immer meine größte Stütze, meine Motivation, mein Leben.